PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

E. BÜNNING-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

45. BAND, 6. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 26 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 19. JULI 1955)

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

Planta (Berl.)

Preis DM 19.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik.

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald als möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä., von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67*.

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

45. Band. Inhaltsverzeichnis. 6. (Schluß-)Heft

Seite

Metzner, H., Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induktion. Mit 8 Textabbildungen 493

Farkas, G. L., und T. Rajháthy, Untersuchungen über die xeromorphischen Gradienten einiger Kulturpflanzen. Mit 4 Textabbildungen 535

Strugger, S., und Th. Butterfass, Zur fluorescenzmikroskopischen Analyse des extrafasciculären Wasserweges in der Avena-Koleoptile. Mit 3 Textabbildungen 549

Söding, H., und M. Wagner, Mehrjährige Versuche über die Beeinflussung der Keimung und Entwicklung von *Poa annua* durch Behandlung der Früchte mit Wirkstoffen. 557

Bopp, M., Die Entwicklung von Zelle und Kern im Protonema von *Funaria hygrometrica* Sibth. Mit 10 Textabbildungen 573

Rosenstock, G., Die spektrale Temperaturkurve von Kartoffelparenchym und ihre Bedeutung für das Lichtatmungsproblem. Kurze Mitteilung. Mit 1 Textabbildung 591

Autorenverzeichnis 596

Planta, Bd. 45, S. 493—534 (1955).

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.

VERÄNDERUNGEN DER BLATTPROTEINE BEI PHOTOPERIODISCHER INDUKTION*.

Von

HELMUT METZNER.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Februar 1955.)

Die Biochemie der Differenzierungsvorgänge ist uns bis heute noch so gut wie unbekannt. In einzelnen Fällen hat sich die Beteiligung von Hormonen nachweisen oder zumindest wahrscheinlich machen lassen; oft jedoch liegen andere Deutungsmöglichkeiten näher. Auch dort aber, wo ein Wirkstoff als auslösender Faktor bekannt ist, wissen wir nahezu gar nichts über die Reaktionsketten, die zur mehr oder weniger stabilen Determination der betreffenden Zellen bzw. Gewebe führen.

Ein Differenzierungsschritt, der als Beispiel für die Fähigkeit alternativen Reagierens meristematischer Zonen gelten darf, ist in der Umstimmung des Vegetationspunktes höherer Pflanzen von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase gegeben. Über die Bedingungen für die Auslösung der Blütenbildung sind wir, vor allem seit der Entdeckung des *Photoperiodismus* (GARNER und ALLARD 1920), gut unterrichtet. Der jahrzehntelangen Erforschung gerade dieses Phänomens verdanken wir die eingehende Kenntnis der Reaktionsweise einiger besonders geeigneter Versuchsobjekte, auf die nun für biochemische Untersuchungen zurückgegriffen werden kann.

Lange noch, bevor die Hormone entdeckt waren, hat man bereits die Blütenbildung der höheren Pflanzen durch die *Annahme eines spezifischen Wirkstoffs* zu erklären versucht (SACHS 1863, vgl. später KNOTT 1934, ČAJLACHJAN 1936a, b, HARDER 1940a, b u. a.). Dem gegenüber steht seit Jahrzehnten die Auffassung, wonach eine Verschiebung im Mengenverhältnis der Assimilate, insbesondere das *C/N-Verhältnis*, die eigentliche Ursache der Entwicklungsumstimmung sein soll (KLEBS 1904, 1906, LOEW 1905, siehe dagegen KNODEL 1936, v. DENFFER 1940), doch konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, daß die Verschiebung des C/N-Verhältnisses lediglich eine Folge der Blüteninduktion ist (TINCKER 1928).

* Habilitationsschrift der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

Für die Existenz eines blütenauslösenden Wirkstoffs lassen sich allerdings gewichtige Argumente anführen: Perceptionsorte des photoperiodischen Reizes sind nur die Laubblätter (HARDER und v. WITSCH 1940, HARDER, BODE und v. WITSCH 1942 u. a.); die Differenzierung der Blütenanlagen hingegen erfolgt am Vegetationspunkt, der selbst vom gebotenen Licht-Dunkel-Wechsel völlig unabhängig zu sein scheint (KNOTT 1934, ČAJLACHJAN 1936a u. a.). Das wirksame Prinzip muß also von den Blättern zur meristematischen Spitzenzone transportiert werden. Dieser Leitungsvorgang ist durch Abkühlung des Gewebes (BORTHWICK, PARKER und HEINZE 1941 u. a.) sowie durch Narkose (ČAJLACHJAN 1941) zu hemmen, dürfte mithin an die Beteiligung lebender Zellen gebunden sein. Mehrfach konnte gezeigt werden, daß das „Blühhormon" nicht allein den eigenen Vegetationspunkt, sondern auch den artfremder Pfropfpartner induzieren, somit nicht artspezifisch sein kann (ČAJLACHJAN 1936b, KUIJPER und WIERSUM 1936, MELCHERS 1937 u. a.). Ein „Hormon"-Austausch zwischen Unterlage und Reis scheint nach den bisherigen Versuchen — trotz einiger weniger gegenteiliger Befunde (z. B. GERHARD 1940) — nur dann stattfinden zu können, wenn es zu einer mindestens lokalen Gewebeverwachsung der Pfropfpartner kommt (MOSHKOV 1939, WITHROW und WITHROW 1943 u. a.); Versuche, das wirksame Prinzip über eine Wasserbrücke hinwegzuleiten, schlugen fehl (vgl. GALSTON 1949). Demnach könnte es sich bei dem blütenauslösenden Wirkstoff um einen nicht exosmierenden oder aber sehr labilen, außerhalb der Zelle rasch unwirksam werdenden Stoff handeln. Die geringe Leitungsgeschwindigkeit des „Blühhormons" (ČAJLACHJAN 1940) könnte weiterhin auf das Vorliegen eines hochmolekularen Komplexes deuten. Alle diese Bedingungen würden von einem Proteohormon erfüllt werden (STEINBERG 1950), doch läßt sich vorläufig noch nicht ausschließen, daß es sich bei dem Wirkstoff um eine schwer wasserlösliche, lipoidartige Substanz handelt.

Vorerst können alle diese Feststellungen aber nur einen Hinweis geben, in welchen Stoffklassen nach einem wirksamen Faktor gesucht werden sollte; denn trotz zahlreicher Bemühungen (HAMNER und BONNER 1938, MELCHERS und LANG 1941 u. a.) ist bis heute die Isolierung eines blütenauslösenden Wirkstoffs nicht gelungen. Zwar wurde vereinzelt behauptet, daß sich aus blühenden Pflanzen wirksame Extrakte gewinnen ließen (BONNER und BONNER 1948, SIRONVAL 1950, ROBERTS 1951 u. a.); abgesehen davon, daß alle diese angeblich positiven Befunde noch der Bestätigung bedürfen, konnte *das wirksame Prinzip in keinem einzigen Falle angereichert, geschweige denn rein dargestellt und identifiziert* werden. Auch alle Versuche, die Blütenbildung durch Verabreichung bekannter Naturstoffe oder auch synthetischer Präparate auszulösen, schlugen fehl (HAMNER und BONNER 1938, EMMERICH 1942, STEINBERG

1950 u. a.)[1]. Die Mitteilungen über die — von MELCHERS und LANG (1941) übrigens nicht zu reproduzierende — blütenauslösende Wirkung eines Safran-Extraktes (ULLRICH 1939) und die induktive Wirksamkeit von Steroidhormonen (SCHOELLER und GOEBEL 1931, CHOUARD 1943 u. a.) bedürfen der Nachprüfung, zumal einigen organischen Substanzen (STEINBERG 1950), u. a. den Sterinen (HARDER und STÖRMER 1935, ZOLLIKOFER 1948), eine unspezifische Entwicklungsbeschleunigung zukommen dürfte.

Zur biochemischen Analyse der Blütenbildung verbleibt uns aber noch ein zweiter Weg: die Untersuchung der Stoffwechselvorgänge vor, während und nach der photoperiodischen Induktion. Entscheidend ist dabei, daß es gelingt, die Vorgänge, die die eigentliche Umstimmung zur reproduktiven Phase bedingen, abzutrennen von Sekundärprozessen, die z. B. während der Differenzierung der einzelnen Blütenteile und der Streckung der Blütenanlagen ablaufen und sicherlich anderen Bedingungen gehorchen als der eigentliche Determinationsprozeß (EGUCHI 1937 u. a.).

Diese notwendige Beschränkung auf die eigentlichen Primärprozesse läßt es von vornherein als wertlos erscheinen, vegetative und blühende Pflanzen gegenüberzustellen. Gerade darin aber haben sich — von ganz vereinzelten Ausnahmen (GARNER, BACON und ALLARD 1924, HIBBARD 1937) abgesehen — alle bisher durchgeführten biochemischen Untersuchungen erschöpft (vgl. SEN 1951). Zumindest wurden die ersten Proben zu spät entnommen (PARKER und BORTHWICK 1939). Photoperiodisch empfindliche Pflanzen benötigen für die Umstimmung zur reproduktiven Phase eine ganz bestimmte Zahl induktiv wirksamer Licht-Dunkel-Zyklen (LANG und MELCHERS 1943 u. a.). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kurztag-*Crassulacee Kalanchoë Bloßfeldiana* kommt zur Blüte, wenn ihr an vier aufeinanderfolgenden Tagen die dieses Objekt optimal induzierende Licht-Dunkel-Periode von 9:15 Std[2] (HAUSCHILD 1943) geboten wird (HARDER und v. WITSCH 1940); nach Vorverdunkelung genügen sogar zwei wirksame Zyklen (VAN SENDEN 1951, BÜNSOW 1953). Mit Abschluß dieser Behandlung ist über die weitere Differenzierung des Vegetationspunktes entschieden; die Pflanzen können jetzt wieder unter nichtinduktive Bedingungen verbracht

[1] Eine gewisse Ausnahme stellen die wenigen Fälle dar, in denen durch Wuchsstoff- (VAN OVERBEEK 1946 u. a.) oder Antiwuchsstoffgaben (ZIMMERMANN und HITCHCOCK 1942, 1949, DE WAARD und ROODENBURG 1948, BONNER und THURLOW 1949 u. a.) Blütenbildung hervorzurufen ist. Diese Fälle haben in der Diskussion über die Physiologie der Blütenbildung eine große Rolle gespielt (vgl. v. DENFFER 1950).

[2] Dunkelzeit unterstrichen.

werden (RASUMOV 1930, HARDER und v. WITSCH 1940)[1]. Innerhalb dieses — für *Kalanchoë* also normalerweise viertägigen — Zeitabschnitts müssen chemische Prozesse ablaufen, die sich von denen in vegetativen Kontrollpflanzen unterscheiden. Demnach besteht die vorerst wichtigste Aufgabe in Untersuchungen, welche Veränderungen im Laufe dieses relativ kurzen Zeitraums faßbar sind; erst in zweiter Linie interessiert ein biochemischer Vergleich blühender und nichtblühender Pflanzen untereinander.

Kaum ein Ergebnis dürfte für die weitere Bearbeitung des Photoperiodismus so vielversprechende Ansatzpunkte bieten wie die *Erscheinung der „fraktionierten Induktion"*. Wie bereits erwähnt, ist zur Entwicklungsumstimmung eine ganz bestimmte, von Art zu Art verschiedene Mindestzahl induktiv wirksamer Zyklen erforderlich. Werden diese nun nicht zusammenhängend dargeboten, sondern jeweils durch eine Anzahl unwirksamer Licht-Dunkel-Wechsel unterbrochen, so zeigen verschiedene Untersuchungen an Langtagpflanzen, daß sich die jeweils erzielten unterschwelligen *„Teilinduktionen"* — zum Teil ohne nennenswerte Verluste — summieren lassen (HAMNER 1940, NAYLOR 1941, LANG und MELCHERS 1943, SNYDER 1948). Trotz aller inzwischen abgelaufenen Mitosen hat also keine wesentliche „Verdünnung" des wirksamen Prinzips stattgefunden. Dieser überraschende Befund läßt sich am zwanglosesten durch die Annahme erklären, daß *eine unter dem Einfluß der wirksamen Zyklen entstandene Substanz zur Selbstreproduktion befähigt* ist (vgl. LANG 1952). Dies braucht nicht zu besagen, daß der von den Blättern zum Vegetationspunkt wandernde Stoff mit diesem autoreproduktivenFaktor identisch sein muß, obwohl unsere gegenwärtigen Kenntnisse uns diese Möglichkeit vorerst nicht auszuschließen erlauben.

Pfropfungen zwischen den entgegengesetzten Reaktionstypen haben den Beweis erbracht, daß der blütenauslösende Wirkstoff nicht nur nicht artspezifisch, sondern auch für Lang- und Kurztagpflanzen identisch ist (LANG und MELCHERS 1948 u. a.). Dennoch scheint bei Kurztagpflanzen eine *verlustlose* Summierbarkeit unterschwelliger Induktionen nicht möglich zu sein (LONG 1939 u. a.). Dafür aber bleibt z. B. bei *Xanthium* eine einmal erfolgte Umstimmung, die durch die Induktion von nur $^1/_8$ eines Blattes erfolgt sein kann, ständig erhalten (HAMNER und BONNER 1938). Durch Übertragen induzierter Blätter lassen sich in nichtinduktiver Tageslänge gehaltene Pfropfpartner zur Blütenbildung umstimmen; einzelne Teile einer solchen indirekt induzierten Pflanze

[1] Die im Anschluß an die induktiven Zyklen gegebene relative Tageslänge vermag allerdings die späteren Differenzierungsschritte noch erheblich zu beeinflussen. Dies ist durch eine Veränderung von Zahl und Ausprägung der ausgebildeten Infloreszenzen erkennbar. Keinesfalls aber ist die einmal erfolgte Induktion reversibel (HARDER 1953 u. a.).

sind zur Weitergabe des „Blühhormons" — angeblich durch mehrere Pfropfgenerationen hindurch! — befähigt (Bonner und Liverman, zitiert nach Lang 1952). Dabei scheint die Neubildung des Wirkstoffs jeweils nur in den Meristemen vor sich zu gehen (Lona 1946). Demnach können *selbstreproduktive Faktoren grundsätzlich auch von Kurztagpflanzen gebildet* werden.

Bis heute ist uns identische Reproduktion mit Sicherheit nur von Proteinen, und auch dort nur unter Beteiligung von Nucleinsäuren, bekannt geworden. Von diesen Überlegungen ausgehend, wurde nun in der vorliegenden Arbeit gerade in der Proteinfraktion nach biochemischen, dem Induktionsprozeß parallel laufenden Veränderungen gesucht.

Die vorliegende Arbeit soll in zwei Teile gegliedert werden, deren erster die Darstellung und Bausteinanalyse der *Kalanchoë*-Zelleiweiße umfaßt. Im zweiten Teil sollen dann die Veränderungen dieser Proteine im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion dargestellt werden.

A. Die Zelleiweiße von *Kalanchoë Bloßfeldiana*.

I. Methodik.

1. Pflanzenmaterial. Biochemische Untersuchungen zur Frage der photoperiodischen Induktion erfordern ein Versuchsobjekt, das als repräsentativ für einen der beiden Reaktionstypen (Kurztag- bzw. Langtagpflanze) angesehen werden kann. Das bedeutet, daß sich die betreffende Versuchspflanze unter nichtinduktiven Bedingungen unbegrenzt vegetativ kultivieren lassen muß. Es ist weiter wichtig, daß sich an der Reaktion der Pflanze — beispielsweise an der zwischen Induktionsbeginn und Anlegen der Blütenprimordien verstreichenden Zeit — die Stärke des „Blühimpulses" möglichst quantitativ erfassen läßt. Um zeitraubende Vorarbeiten zu vermeiden, benötigt man ferner bereits genaue Angaben über das physiologische Verhalten des Objekts, so u. a. über die Zahl der unter verschiedenen Bedingungen erforderlichen induktiven Licht-Dunkel-Zyklen, über die kritische Tageslänge sowie bei Kurztagpflanzen möglichst auch über die Reaktion auf nächtliches Störlicht.

Nur sehr wenige Objekte erfüllen alle diese Anforderungen, unter den Kurztagpflanzen z. B. die *Crassulacee Kalanchoë Bloßfeldiana*. Leider ist diese Pflanze aber für biochemische Untersuchungen denkbar ungeeignet: Ihre Laubblätter enthalten erhebliche Säure- und Gerbstoffmengen, die eine Analyse der Zellproteine erheblich erschweren (s. u.). In Anbetracht des ungewöhnlich reichen Beobachtungsmaterials, das — vor allem durch die Untersuchungen von Harder und Mitarbeitern — gerade über dieses Objekt vorliegt, wurden die folgenden Versuchsreihen aber dennoch mit der *Kalanchoë* durchgeführt.

Das Saatgut wurde von den seit nunmehr fast zwei Jahrzehnten durch ständige Selbstung vermehrten Vorratsexemplaren des Göttinger Botanischen Gartens gewonnen; das ursprüngliche Samenmaterial war seinerzeit von der Firma Bloßfeld (Potsdam) bezogen worden.

Die Samen wurden in „Standarderde" (Gemisch gleicher Mengen von Ton und Humintorf unter Zusatz von Kalium- und Ammoniumsulfat sowie Superphosphat) ausgesät und unter Gewächshausbedingungen herangezogen. Im Alter von 6 bis 9 Monaten gelangten die Pflanzen dann in die Versuche. Da die Klimaräume des Instituts noch nicht betriebsfertig waren, wurden die Versuche im Gewächshaus durchgeführt. Gewisse Schwankungen der Außenbedingungen mußten dabei in Kauf genommen werden. Während der jeweils achttägigen Versuchsreihen wurden aber die Temperaturen so konstant wie nur möglich gehalten; während der Heizperiode (Oktober—Mai) konnte die Temperatur tagsüber auf 18° C gehalten werden; nachts fiel sie auf 15—16° C. Bei den im Hochsommer angesetzten Versuchsreihen war es allerdings nicht zu vermeiden, daß die Temperatur an sonnigen Tagen bis auf 25° C anstieg.

Zur chemischen Untersuchung wurden nur solche Pflanzen ausgewählt, die völlig normal entwickelte Blattwirtel zeigten; alle Exemplare mit vergilbten oder sonstwie geschädigten Blättern wurden aussortiert. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Seitenknospen regelmäßig entfernt, so daß junge Blattanlagen nur an der Sproßspitze vorhanden waren. Geerntet wurden stets nur die vier jüngsten Blattwirtel, deren Blätter eine maximale Fläche von ≈ 3 cm² (ausgewachsenes Blatt ≈ 18—20 cm²) erreichten.

Zum Schutz gegen Mehltaubefall wurden die Jungpflanzen mit einer Netzschwefel-Suspension (Präparat „Kumulus" der Badischen Anilin- & Sodafabrik, Ludwigshafen) gesprüht. Diese Behandlung unterblieb aber in den letzten Wochen vor Versuchsbeginn, so daß die für die Analysen verwendeten Blätter der Spitzenregion nie mit dem Schwefelpräparat in Berührung gekommen waren. Diese Vorsichtsmaßnahme erschien angebracht, nachdem BLOUCH, PAYNE und FULTS (1952) zeigen konnten, daß gewisse Spritzmittel einen Einfluß auf das Mengenverhältnis der freien Aminosäuren ausüben können.

2. Isolierung der Zellproteine. Über die Isolierung von Zellproteinen aus Blättern liegen schon eine ganze Reihe von Untersuchungen vor (vgl. CHIBNALL 1939, BONNER 1950, WILDMAN und JAGENDORF 1952). Entweder wurde der Aufschluß der Pflanzen unter verdünnten Laugen (CROOK 1946) oder wäßrigen Puffern (WILDMAN und BONNER 1947 u. a.) durchgeführt oder aber es wurde mit der von LUGG (1939) eingeführten Boratpuffer-Äthanol-Äther-Mischung gearbeitet (LUGG und WELLER 1948, FOWDEN 1952a, b, 1954, YEMM und FOLKES 1953 u. a.). Zweifellos hat die Anwendung dieser Methoden zu wertvollen Erkenntnissen geführt, obschon nur in wenigen Fällen beurteilt werden kann, inwieweit dem isolierten Protein noch die ursprünglichen Eigenschaften zukommen dürften (s. u.). Alle bisher angegebenen Verfahren versagen aber im Falle der *Kalanchoë*.

Das Hauptproblem bei der Gewinnung der *Kalanchoë*-Proteine besteht in der *Beseitigung der Gerbstoffe*. Diese bilden mit Eiweißen innerhalb eines weiten p_H-Bereichs schwerlösliche Fällungen, aus denen sich der Proteinanteil nicht wieder nativ zurückgewinnen läßt. Das führt dazu, daß eine Zerkleinerung der Blätter unter wäßrigen Puffern nur eine sehr geringe Ausbeute an Proteinen ergibt (vgl. auch WAYGOOD und CLENDENNING 1950). Es muß also versucht werden, die Gerbstoffe in einer solchen Art abzufangen, daß es gar nicht erst zur Fällung der Proteine kommt. Theoretisch ist dies möglich durch Anwendung eines Puffers, dessen Wasserstoffionenkonzentration noch unterhalb des isoelektrischen Punktes

der am stärksten basischen Proteinkomponente liegt. Gerbstoff-Eiweiß-Komplexe sind in diesem alkalischen p_H-Bereich nicht mehr beständig (DANIELSSON 1948). In Einzelfällen mag dieser Weg gangbar sein; bei der Untersuchung der Gesamteiweiße einer Pflanzenzelle scheidet er aber aus, da die isoelektrische Reaktion der basischen Proteine erst bei so hohen p_H-Werten überschritten wird, daß eine Denaturierung der empfindlicheren Komponenten nicht ausgeschlossen werden kann.

Aus wäßrigen Lösungen lassen sich Gerbstoffe z. B. durch Zusatz von Hautpulver entfernen. Diese Abtrennung hat sich für spezielle Fälle, wo mit einzelnen Proteinen, insbesondere mit Fermenten, gearbeitet wurde, gut bewährt (EHRENBERG 1954). Nach meinen eigenen Feststellungen vermag auch Zellulosepulver (Herstellung siehe bei TURBA 1954) große Gerbstoffmengen aufzunehmen. Diese auch früher schon beobachtete adsorptive Bindung zwischen Polysacchariden und Gerbstoffen (FREUDENBERG 1933) ist aber für quantitative Untersuchungen nicht anwendbar, da nach eigenen Erfahrungen mit der Papierelektrophorese von Blattproteinen (noch unveröffentlicht) auch verschiedene pflanzliche Eiweiße — insbesondere basische Proteine — an Zellulose adsorbiert werden (siehe auch CHRISTIANSEN 1912).

Auch von der Möglichkeit, die Gerbstoffe, beispielsweise durch NaCl, auszusalzen, kann man keinen Gebrauch machen, da die erforderlichen Salzmengen auch einen erheblichen Teil der Proteine niederschlagen würden.

Vielleicht aber ist es möglich, die Schwerlöslichkeit der Additionsverbindungen zwischen Gerbstoffen und gewissen Alkaloiden (PFEIFFER 1927) auszunutzen. In orientierenden Versuchsreihen gelang es, durch Homogenisieren der Blätter in einer coffeinhaltigen Pufferlösung den größten Teil der Gerbstoffe auszufällen. Möglicherweise läßt sich, von dieser Beobachtung ausgehend, ein brauchbarer Weg zur quantitativen Abtrennung der Gerbstoffe finden. Es bleibt aber zu beachten, daß Coffein die Viskosität von Proteinsolen erhöht, also offenbar das Protein nicht völlig unverändert läßt[1].

In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit wurde der umgekehrte Weg eingeschlagen: die reversible Fällung der Proteinfraktion und das Auswaschen der Gerbstoffe. Der *Kalanchoë*-Gerbstoff, dem nach EHRENBERG (1954) eine ähnliche Zwischenstellung zwischen Catechinen und Tanninen zukommen soll wie dem Eichenrinden-Gerbstoff, ist in verschiedenen organischen Lösungsmitteln gut löslich, u. a. in Aceton, Äthanol und Essigester. Von diesen vermögen Äthanol und Aceton die Proteine zu fällen. Sofern bei tiefen Temperaturen gearbeitet wird, ist dieser Niederschlag für eine gewisse Zeit reversibel. Vor allem wird unter den Gefrierpunkt abgekühltes Aceton verhältnismäßig lange ohne erkennbare Schädigung vertragen (vgl. HAUROWITZ 1950). Das Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln bedingt aber eine besonders sorgfältige Kontrolle der Wasserstoffionenkonzentration, da bei saurer Reaktion des Homogenisats sehr leicht irreversible Ausflockungen eintreten (ZIESE 1933).

Nach ausgedehnten Vorversuchen wurde schließlich folgender Arbeitsgang eingeschlagen: Die — stets zur gleichen Tageszeit (3 Std nach

[1] Diese Proteinänderung scheint allerdings die biologische Aktivität nicht merklich zu beeinflussen; denn durch Behandlung lebender Gewebe mit Coffeinlösungen lassen sich intrazelluläre Gerbstoff-Alkaloid-Komplexe ausfällen, ohne daß es — zumindest bei kurzfristigen Versuchen — zu einer erkennbaren Schädigung kommen soll (VAN WISSELINGH 1910).

Lichtbeginn)[1] — frisch gepflückten, sorgfältig gewaschenen Blätter wurden zunächst auf etwa 1—2° C abgekühlt (vgl. WILDMAN und BONNER 1947) und dann im Homogenisator („Starmix") mit einer solchen Menge tiefgekühlten (—20° C) Acetons übergossen, daß unter Berücksichtigung des Blattwassergehalts eine Endkonzentration des Lösungsmittels von 90—95% resultierte[2]. Die beim Aufschluß der Zellen frei werdenden organischen Säuren wurden sofort neutralisiert. Dabei kann man der beträchtlichen tagesperiodischen (und auch jahreszeitlichen) Säureschwankungen der *Kalanchoë* wegen (vgl. z. B. BECKER 1953) nicht mit äquimolaren Laugenzusätzen arbeiten. Statt dessen wurde im Aceton fein zerriebenes Magnesiumoxyd suspendiert, das auch im Überschuß keine merklich alkalische Reaktion hervorruft (vgl. RÖMPP 1947). Sind alle mit dem Homogenisat in Berührung kommenden Geräte, insbesondere die Messer und der Becher des „Starmix" sowie die Nutsche (s. u.), zuvor auf —20° C abgekühlt, so kann man im Kühlraum (—5° C) etwa 90 sec lang mit voller Tourenzahl (12000 Umdrehungen/min) homogenisieren, ohne daß die Temperatur des Blattbreis den Gefrierpunkt überschreitet[3].

Das fertige Homogenisat wurde sogleich am Wasserstrahlvakuum abgenutscht und mehrfach mit gekühltem Aceton nachgewaschen. Bei Verwendung eines Hartfilters (Schleicher & Schüll 1575, Porenweite 1,5 μ) werden keine Eiweiße mit in das Filtrat hineingerissen. Der Zeitaufwand für den Aufschluß und das Auswaschen ließ sich bei einiger Übung schließlich bis auf 7—8 min herabdrücken. Es verbleibt dann ein weißes, bisweilen schwach gelblich gefärbtes Pulver, das in der Hauptmasse aus Zellwandbestandteilen und aus den Zellproteinen zusammengesetzt ist. Als N-haltige Bestandteile liegen aber neben den Proteinen noch Phosphatide vor, die mit Aceton nur sehr unvollkommen auszuwaschen sind (WINTERSTEIN und WINTERSTEIN 1932). Für den weiteren Aufarbeitungsgang empfiehlt es sich, diese durch sofort anschließende Extraktion des acetonfeuchten Blattbreis mit Äther zu entfernen (vgl. MORTON 1950). Dabei bietet die Verdrängung des Acetons

[1] Durch die Entnahme der Versuchspflanzen zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die unter verschiedenen Licht-Dunkel-Zyklen gehaltenen Exemplare in einer vergleichbaren Phase ihrer endogenen Tagesrhythmik (BÜNNING 1937) befinden dürften, wurde auf eventuelle diurnale Veränderungen der Eiweißfraktion (vgl. z. B. SIDERIS, YOUNG und CHUN 1948) Rücksicht genommen.

[2] Bei geringerem Acetongehalt als 80% ist eine Denaturierung der Blattproteine nicht auszuschließen (HAUROWITZ 1950).

[3] Der Aufschluß unter Aceton bietet gegenüber dem Homogenisieren von Geweben in wäßrigen Medien den großen Vorteil, daß es zu keiner nennenswerten Schaumentwicklung kommt. Da zahlreiche Proteine zur Denaturierung an Oberflächen neigen, muß man anderenfalls stets darauf bedacht sein, Schaumbildung, z. B. durch Zusatz von Silicon-Ölen, zu unterdrücken.

durch den niedriger siedenden Äther überdies den Vorteil, daß sich das Blattpulver später rascher trocknen läßt.

Der ätherfeuchte Rückstand wurde in dünner Schicht in flachen Porzellanschalen oder auf saugfähigem, nicht faserndem Filtrierkarton ausgebreitet und im Vakuumexsiccator getrocknet. Man erhält so ein überaus leichtes weißes Pulver, das sich als nahezu frei von in Trichloressigsäure und 70%igem Äthanol löslichen N-Bestandteilen erweist. Die Anwendung der „Eisenprobe" mit abgestandener Ferrosulfatlösung (FREUDENBERG 1932) läßt nur mehr geringe — an der Zellulose offenbar hartnäckig adsorbierte — Gerbstoffreste erkennen.

Sofern das Trockenpulver nicht sofort weiterverarbeitet werden konnte, wurde es (bei 0° C) im verdunkelten Vakuumexsiccator aufbewahrt. Dieses Präparat enthält die Proteine noch in nativer Form. Es erhebt sich aber die grundsätzliche Frage, ob man bei Proteinen, die aus dem Zusammenhang der lebenden Zelle herausgelöst wurden, überhaupt von einer „nativen" Form sprechen sollte. Zumindest ein großer Teil der Eiweiße liegt in der Zelle in Form großer Komplexe, z. B. mit Lipoiden und Kohlenhydraten vereinigt, vor. Werden alle diese Reste sorgfältig abgetrennt, so kann die Bezeichnung „nativ" wohl kaum mehr ausdrücken, als daß bei den nunmehr isoliert vorliegenden Eiweißen noch die fermentative Wirksamkeit und serologische Spezifität vorhanden sind. Sofern man auf die Erhaltung des physikochemischen Zustandes dieser „nativen" Präparate Wert legen muß, hat man die Abtrennung der im Trockenpulver vorliegenden Proteine von ihren Begleitstoffen (Polysacchariden) unter großen Vorsichtsmaßregeln vorzunehmen. Borathaltige Pufferlösungen machen tatsächlich die Gewinnung der Eiweiße möglich, vorausgesetzt, daß eine entsprechend niedrige Temperatur eingehalten und Schaumbildung vermieden wird. Es empfiehlt sich dabei, die zur Aufarbeitung und Aufbewahrung der Proteinlösungen benutzten Gefäße mit einem Silicon-Überzug zu versehen. Für besonders geeignet halte ich das „Imprägnierungsmittel WS 60" (Wacker-Chemie München). Dieses Silicon hat gegenüber ähnlich wirkenden Präparaten den Vorteil, daß es sich bei Trockenschranktemperaturen (150° C) „einbrennen" läßt. Der wasserabweisende Film ist außerordentlich beständig und braucht nur gelegentlich erneuert zu werden.

Die ersten Versuchsreihen wurden mit nativen Eiweißen begonnen. Es wurde versucht, durch fraktioniertes Aussalzen in Phosphatlösungen abgestufter Konzentration (vgl. DERRIEN 1952), durch reversible Fällung in Methanol- und Acetonlösungen (KNÜCHEL 1951) sowie durch elektrophoretische und papierelektrophoretische Trennungen Unterschiede in der Eiweißfraktion von vegetativen und induzierten *Kalanchoë*-Exemplaren aufzufinden. Wenn sich auch, vor allem in den Aussalzversuchen, gewisse Differenzen erkennen ließen (METZNER 1954a), so erschienen doch alle eingeschlagenen Wege als für Serienversuche ungeeignet.

Statt dessen wurde in weiteren Vorversuchen geprüft, ob sich zwischen den Proteinen der induzierten und nichtinduzierten *Kalanchoë*-Exemplare rein chemische Differenzen erkennen lassen. Da dies tatsächlich der Fall war (METZNER 1954a), brauchte für die weiteren Versuche keine so schonende Extraktion des — im übrigen aber unverändert gewonnenen — Trockenpulvers angestrebt zu werden. Selbst eine Denaturierung konnte nun in Kauf genommen werden, da durch sie nur die biologische Aktivität (PUTNAM 1953 u. a.) sowie die physikochemischen Eigenschaften der Proteine (Ladung, Molekulargewicht, Faltungszustand u. dgl.), nicht aber deren chemische Zusammensetzung verändert werden

(NEURATH, GREENSTEIN, PUTNAM und ERICKSON 1944 u. a.). Damit konnte für die Hauptversuche ein vereinfachter Arbeitsgang gewählt werden:

Das Trockenpulver wurde zunächst in einer Kolloidmühle (System BLOCH-ROSETTI) zu einer staubfeinen Masse aufgemahlen, die dann mit der 100fachen (Gewichts-)Menge 1 n NaOH versetzt und im verschlossenen Porzellanmörser der Kolloidmühle 2 min lang umgeschwenkt wurde. Die Suspension wurde dann durch eine Glasfilternutsche (G 3) gesaugt und der Extrakt anschließend noch einmal durch Papier filtriert. Es resultierte eine gelbe bis leicht rötliche Lösung, in der die Proteine als denaturierte Eiweißanionen vorliegen. Dieser Extrakt wurde sofort mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und dann bis zur 5%igen Endkonzentration mit kristalliner Trichloressigsäure versetzt. Die Gläser mit den nunmehr stark getrübten Lösungen wurden bis zum Zusammenflocken der gefällten Proteine im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die koagulierten Eiweiße abzentrifugiert, in einzelnen Fällen noch mit Methanol nachgewaschen. Die nunmehr von ihren Begleitsubstanzen weitgehend gereinigten Präparate dienten als Ausgangsmaterial für alle weiteren Analysen.

3. Hydrolyse. Die Aufspaltung der Proteine bis zu den Aminosäuren erfordert eine längere Hydrolyse, die außer durch die entsprechenden Fermente auch durch Säuren oder Laugen erfolgen kann. Die fermentative Spaltung ist ein an sich sehr zuverlässiges Verfahren, bei dem die sonst unvermeidlichen Veränderungen empfindlicher Komponenten auf ein Minimum reduziert sind. Dafür aber kommt es zu einer Verunreinigung der Hydrolysate durch Autolyseprodukte des Enzyms.

Die alkalische Hydrolyse bietet den Vorteil der besseren Erhaltung einzelner Komponenten; zum Nachweis des Tryptophans ist sie neben der fermentativen Spaltung die einzig mögliche Methode. Dafür aber werden andere Aminosäuren starken sekundären Veränderungen unterworfen. So entstehen z. B. aus Arginin Citrullin und Ornithin, aus Threonin Glykokoll und α-Aminobuttersäure und aus Serin Glykokoll, α-Alanin u. a. (WIELAND und WIRTH 1949). Hinzu kommt die Schwierigkeit, die Lauge wieder aus den Hydrolysaten zu entfernen.

Saure Hydrolysen, die mit Mineralsäuren oder auch stark sauren Ionenaustauschern (UNDERWOOD und DEATHERAGE 1952) durchgeführt werden können, zerstören zwar das Tryptophan nahezu völlig (ACKERMANN, BLIX, FELIX, GRASSMANN, SCHNEIDER und TRUPKE 1951) und einige andere Komponenten wie Arginin, Serin, Threonin, Cystin und die cyclischen Aminosäuren zu einem schwer bestimmbaren Prozentsatz (MARTIN und SYNGE 1945, REES 1946)[1], verändern dafür aber die frei werdenden Aminosäuren nicht in ihrer Struktur; die im Eiweiß präformierten Amide (Glutamin und Asparagin) werden zu den entsprechenden Säuren abgebaut (ACKERMANN und Mitarbeiter 1951). Besonders günstig ist die Verwendung von Salzsäure, die durch Vakuumdestillation wieder aus den Hydrolysaten zu entfernen ist; sie läßt die Aminosäuren in Form der wesentlich besser wasserlöslichen Hydrochloride zurück (HAUROWITZ 1950).

[1] Die vielfach vorgenommene Korrektur der für die empfindlichen Komponenten ermittelten Mengenverhältnisse durch Bestimmung ihrer Hydrolyseverluste in reiner Lösung ist von sehr zweifelhaftem Wert, da das Ausmaß der Zersetzung von Begleitstoffen erheblich beeinflußt werden kann (FISCHER und DÖRFEL 1953).

Für die weitere Aufarbeitung der *Kalanchoë*-Proteine erschien danach eine Hydrolyse mit 6 n Salzsäure als geeignetste Methode. Das Eiweiß — in der Regel Mengen von rund 30 mg — wurde in starkwandigen Reagensgläsern mit der 100fachen (Gewichts-)Menge an HCl versetzt. Einem Vorschlag von SIFFERD (1949) folgend, wurde die Säure mit der gleichen Menge Amylalkohol überschichtet; diese Maßnahme soll die Hydrolyseverluste empfindlicher Komponenten deutlich vermindern[1].

In einzelnen Kontrollserien zur Identifizierung der Eiweißbausteine wurde auch mit gesättigter Barytlauge hydrolysiert. Dabei läßt sich das Barium durch Zusatz von Schwefelsäure wieder aus den Hydrolysaten abscheiden, doch ist schwer zu beurteilen, welche Aminosäuremengen adsorptiv mit in den Niederschlag gerissen werden.

Die Gläser wurden dann am Gebläse verschmolzen und, in Kieselgur verpackt, im Trockenschrank einer Temperatur von 105° C ausgesetzt. Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß zwischen der 48. und 60. Std keine erkennbaren Veränderungen mehr eintreten, wurde 48 Std lang hydrolysiert. Nach dem Erkalten zeigten die Gläser keine Huminausfällungen; die alkoholische Phase war gelblich gefärbt, die wäßrige völlig klar.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die zugeschmolzenen Gläser im Eisschrank aufbewahrt. Dann wurden der Alkohol und die Säure (bei Temperaturen unterhalb 30° C) im Vakuum abgedampft, der Rückstand zweimal mit Wasser aufgenommen und erneut getrocknet. Erst dann wurde er mit 1 cm³ Aqua bidest. aufgenommen, so daß eine etwa 3%ige Aminosäurelösung entstand. Ein Teil dieser Lösungen wurde sofort zur Chromatographie verwendet; der Rest wurde für eventuell erforderlich werdende Kontrollen im Eisschrank aufbewahrt. Sollen Lösungen für längere Zeit erhalten werden und will man einen Zusatz von Desinfektionsmitteln vermeiden, so empfiehlt es sich, die Lösungen durch bakteriendichte Membranen zu filtrieren; am besten überträgt man sie durch Druck- oder Zentrifugenfiltration (METZNER 1953) sogleich in die zuvor sterilisierten Aufbewahrungsgläschen.

4. Chromatographie. Eines der zur Zeit leistungsfähigsten Verfahren zur Fraktionierung von Eiweißhydrolysaten ist zweifellos die Austauscherchromatographie. Leider aber ist diese Trennung sehr zeitraubend und daher für Serienuntersuchungen ungeeignet. Aus diesem Grunde mußte auf die *Papierchromatographie* zurückgegriffen werden, die eigentlich ein qualitatives Verfahren ist, bei sorgfältiger Standardisierung der Methodik aber auch für quantitative Arbeiten eingesetzt werden kann.

Zunächst wurden verschiedene Papiersorten ausprobiert; die im folgenden veröffentlichten Versuchsreihen wurden, soweit es sich um ein- und zweidimensionale Trennungen handelt, auf dem Papier 2043 b Mgl (Schleicher & Schüll) durchgeführt. Für die mit der Rundfiltermethode ausgeführten Vergleichschromatogramme wurde — der höheren Trennschärfe wegen — das härtere Papier 2045 b Gl der gleichen Firma gewählt.

[1] Das SIFFERD (1949) erteilte US-Patent spricht von einer Überschichtung der Hydrolysesäure durch aliphatische Alkohole mit 4—6 C-Atomen. Von diesen kommen aber nach meinen eigenen Versuchen nur wenige Vertreter in Betracht, da die meisten sich mit heißer Salzsäure völlig mischen.

Durch geeignete Formgebung der Papierstreifen kann man den an sich geringen Trenneffekt der eindimensionalen Chromatographie wesentlich verbessern (vgl. GANGULI 1954, MATTHIAS 1954). Die Papiere wurden entsprechend der Abb. 1 zugeschnitten. Die Probe wurde dann jeweils am Punkt A aufgetragen, wobei der Durchmesser des Flecks kleiner als 1 cm gehalten wurde. Sodann wurden die invers aufgehängten Bogen mit der späteren Oberkante in Aqua dest. eingetaucht und diese bis zur Front B aufgesaugt. Die Aminosäuren wandern dabei mit der Flüssigkeitsfront und werden zu einer schmalen Bande auseinandergezogen[1]. Diese Ausführungsform hat vor der sonst üblichen Methode der chromatographischen Trennung unmittelbar vom Auftrageort an den Vorteil, daß auch die langsamsten Komponenten von vornherein über die volle Breite der einzelnen Streifen verteilt

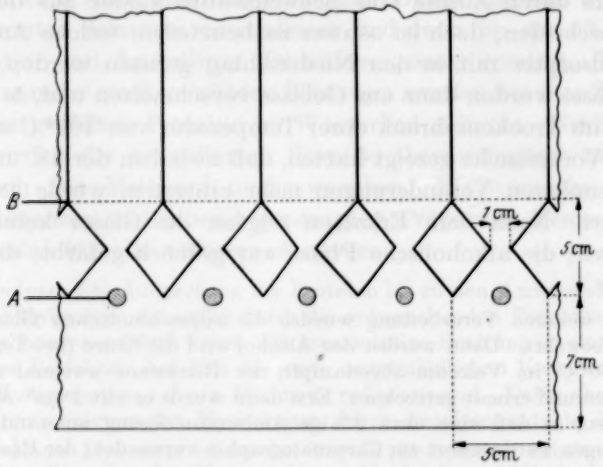


Abb. 1. Form des Chromatographiebogens. (Erklärungen siehe im Text.)

werden. Für eine eventuelle spätere quantitative Auswertung der Chromatogramme ist dies von großer Bedeutung (s. u.).

Sobald der feuchte Papierrand (an der Luft) wieder völlig getrocknet war, wurde der Bogen in die aus einem großen Aquarium bestehende Chromatographiekammer eingehängt und für mindestens 6 Std mit dem Lösungsmitteldampf gesättigt. Erst dann wurde das Lösungsmittel durch eine verschließbare Bohrung in der Deckelplatte eingefüllt und so lange absteigend[2] entwickelt, bis nur mehr ein 3 cm breiter Rand am Bogenende unbenetzt geblieben war. In einzelnen Fällen, in denen besonderer Wert auf die Erfassung der langsam laufenden Komponenten gelegt wurde, wurde der untere Bogenrand zu Zungen aufgeschnitten und das Lösungsmittel dann für längere Zeit (bis zu 4 Tagen) abtropfen gelassen (vgl. TURBA 1954).

Alle verwendeten Chemikalien waren vom höchsten im Handel befindlichen Reinheitsgrad. Sie wurden jedoch nicht redestilliert; lediglich das — nur in Vor-

[1] Um das „Überlaufen" einzelner Komponenten in Nachbarstreifen zu verhindern, wurden die Bogen durch Zerschneiden längs der Streifenkanten aufgetrennt. Lediglich an Ober- und Unterkante blieben jeweils einige Zentimeter breite Ränder unzerteilt.

[2] Einzelne Streifen wurden auch aufsteigend entwickelt, doch schien die größere Laufstrecke der Lösungsmittel bei der absteigenden Form ein Vorteil zu sein.

versuchen benutzte — Phenol wurde durch Vakuumdestillation über Zinkstaub gereinigt (vgl. WIELAND und WIRTH 1949). Die für die quantitativen Auswertungen (s. u.) angesetzten Bogen wurden mit jeweils frisch bereiteten Gemischen chromatographiert; gebrauchte Mischungen wurden nur für qualitative Kontrollen verwendet.

Um Entmischungsvorgänge und damit „Verschmieren" der Chromatogramme zu verhindern, erfordert das Arbeiten mit Kombinationen nur begrenzt miteinander mischbarer Lösungsmittel die Einhaltung eines oft sehr engen Temperaturintervalls. Die Versuche wurden daher in einem Dunkelraum ausgeführt, der sich durch Regulieren der Heizung auf 23,5 $\pm$ 0,5° C halten ließ. Einige Vorversuche wurden — ohne daß wesentliche Abweichungen auftraten — bei einer Temperatur von 17,5 $\pm$ 0,5° C durchgeführt.

Für die zweidimensionale Chromatographie, die auf- wie absteigend angesetzt wurde, wurde der Fleck, der bei einem Durchmesser von 1 cm etwa 300 γ Aminosäuren enthielt (entsprechend etwa 10 mm³ 3%iger Lösung), etwa 7 cm von beiden Rändern entfernt in einer Ecke des Bogens aufgesetzt. Bei allen Versuchen, bei denen mehrmaliges Auftragen erforderlich war, wurden die Flecken zwischendurch mit einer Infrarotlampe (Philips Rubinglaslampe 150 Watt) getrocknet. Die Bogen wurden stets so in die Chromatographiekammern eingehängt, daß das erste Lösungsmittel senkrecht zur Faserrichtung des Papiers laufen mußte.

Der Technik von RUTTER (1948) folgend, wurde die Ringchromatographie auf zwischen Exsiccatorunterteil und -deckel eingeklemmten Papierscheiben (Schleicher & Schüll 2045 b Gl) von 29 cm Durchmesser ausgeführt. Dabei wurden längs der Peripherie eines Mittelkreises von 24 mm Durchmesser jeweils 8 Proben aufgetragen (vgl. GIRI und RAO 1952). Die Zuleitung des Lösungsmittels erfolgte mittels eines aus Filtrierkarton geschnittenen Dochtes von 6 mm Breite. Die Trennung wurde abgebrochen, sobald die Lösungsmittelfront den inneren Deckelrand erreicht hatte. Eine vorherige Sättigung des Gasraums mit dem Lösungsmitteldampf erschien bei der Rundfilterchromatographie nicht erforderlich (vgl. auch SAIFER und ORESKES 1953).

Die ausentwickelten Chromatogramme wurden zunächst für 1—2 Std in einem gut ventilierten Zimmer aufgehängt, anschließend dann im Trockenschrank (90° C) zu Ende getrocknet[1]. Die vom Lösungsmittel völlig befreiten Streifen bzw. Bogen wurden dann mit den entsprechenden Reagentien behandelt. In der Regel wurden sie mit einer 0,2%igen Lösung von Ninhydrin in einer n-Butanol-2n-Essigsäure-Mischung (19:1) besprüht. Einzelne der zur Identifizierung angesetzten Chromatogramme, insbesondere Rundfilter, wurden in einer 0,1%igen Lösung von Natrium-β-naphthochinonsulfonat in Aceton gebadet. In diesem Falle nehmen die einzelnen Komponenten bei der anschließenden Trocknung rosarote Farbtönungen an, die dann in einer Mischung des erwähnten Reagens mit 5 n äthanolischer Natronlauge (3:10) in intensive, für die einzelnen Aminosäuren verschiedene Farbtöne umschlagen (GIRI und NAGABHUSHANAM 1952). Insbesondere lassen sich mit dieesr Methode die sonst nur schwach gelb gefärbten Iminosäuren (Prolin und Oxyprolin) erfassen, doch wurde deren Vorkommen stets noch durch Entwickeln mit dem von ACHER, FROMAGEOT und JUTISZ (1950) angegebenen Isatin-Reagens belegt.

Die Farbentwicklung auf den mit Ninhydrin und Isatin behandelten Papieren erfolgte in einer 90° C warmen wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Dabei wird

[1] Da kein geeigneter Trockenschrank zur Verfügung stand, mußten bei den — nur für qualitative Untersuchungen angesetzten — zweidimensionalen Chromatogrammen Trocknung und Farbentwicklung bei Zimmertemperatur vorgenommen werden.

der optimale Färbungsgrad nach 10 min erreicht (REDFIELD und BARRON 1952); Aminosäureverluste sind bei dieser Trocknungstemperatur noch nicht zu befürchten (TURBA 1954). Die im FOLINschen Reagens (Natrium-β-naphthochinonsulfonat) entwickelten Chromatogramme wurden bei Zimmertemperatur getrocknet.

Auf einzelnen Chromatogrammen wurde die Ninhydrinfärbung durch Ansprühen mit dem von KAWERAU und WIELAND (1951) angegebenen Cu-Reagens haltbar gemacht.

II. Ergebnisse.

a) Extrahierbarkeit der Blattproteine.

Zunächst war zu klären, ob das Acetontrockenpulver-Verfahren in der im methodischen Teil dargestellten Ausführungsform anwendbar ist. Wie bereits erwähnt, konnte festgestellt werden, daß das vom Blattbrei abgenutschte Aceton keine durch Erhitzen oder Zusatz von Trichloressigsäure ausfällbare N-Fraktion enthält. *Das beweist, daß die Zellproteine quantitativ in das Trockenpulver übergehen.*

Wiederholte Kontrollen der Extrakte (durch KJELDAHL-Analyse) ergaben, daß sich mehr als 80% des im Trockenpulver festgelegten Protein-N in Lösung bringen lassen. Will man diese Ausbeute mit den in der Literatur mitgeteilten Werten vergleichen, so muß zuvor geprüft werden, inwieweit sich die Angaben der betreffenden Autoren auch auf die Eiweiße der Zellorganellen beziehen.

Präparate, die Anteile aller Zelleiweiße enthalten, dürften — wenn man von CROOKs Befunden (1946) absieht — bisher nur mit der LUGGschen Boratpuffer-Äthanol-Äther-Mischung extrahiert worden sein. Während CHIBNALL, MILLER, HALL und WESTALL (1933) mit ungepuffertem Äther-Wasser-Gemisch bis zu 30% der Zelleiweiße in Lösung bringen konnten, gelangte LUGG (1939) mit seiner gepufferten Mischung zu Ausbeuten über 90%. FOWDEN (1952a, 1954) konnte mit gleicher Methodik ebenfalls mehr als 90% aller Proteine der von ihm untersuchten Algen isolieren. Bei diesen Berechnungen ist die Proteinausbeute allerdings auf den Anteil der durch den Aufschluß zerstörten Zellen bezogen worden. Bezieht man statt dessen auf die Gesamtmenge des analysierten Pflanzenmaterials, so erniedrigen sich diese Ausbeuten um rund 10%. Der Ätherzusatz spaltet offenbar die sonst unlöslichen Lipoproteidkomplexe insbesondere der Chloroplasten, wie dies ähnlich auch durch Netzmittel und andere oberflächenaktive Substanzen, z. B. gallensaure Salze (SMITH 1941, STOLL, WIEDEMANN und RÜEGGER 1941 u. a.), nicht aber durch rein mechanischen Aufschluß möglich ist (vgl. BONNER 1950).

Verzichtet man auf diese denaturierend wirkenden (PUTNAM 1953 u. a.) Zusätze zum Extraktionsmittel, so erfolgt eine Trennung zwischen den im jeweils verwendeten Puffer leichtlöslichen — durch Beschleunigungen von 20000 g nicht zu sedimentierenden (WILDMAN und BONNER 1947, BONNER 1950) — Proteinen und den unter gleichen Bedingungen

nicht molekulardispers löslichen Proteinkomponenten. Es hat sich eingebürgert, erstere als „*Cytoplasmaproteine*", letztere als „*Chloroplastenproteine*" zu bezeichnen. *Diese unglücklich gewählten Begriffe dürfen keinesfalls zu der Ansicht verleiten, daß in diesen Fraktionen die Proteinkomponenten cytologisch definierter Einheiten vorliegen.* Vielmehr sollte man besser von „wasserlöslichen" (bzw. „pufferlöslichen") und „wasserunlöslichen" Komponenten sprechen, wobei dann von Fall zu Fall zu untersuchen wäre, in welchem Verhältnis sich diese Fraktionen auf die einzelnen Zellelemente verteilen. Es erscheint dabei durchaus denkbar und sogar wahrscheinlich, daß man die Hauptmasse der wasserlöslichen Proteine im Cytoplasma wird lokalisieren dürfen, doch besitzen ohne Frage auch der Kern und wahrscheinlich auch die übrigen Zellorganellen einzelne wasserlösliche Eiweiße. Hinzu kommt noch, daß durch Komplexbildung oder adsorptive Bindung ein Teil der an sich löslichen Proteine mit in das Sediment gelangen kann (vgl. METZNER 1954b).

Die sog. „Cytoplasmaproteine" wurden vielfach isoliert (vgl. BONNER 1950); sie dürften aber lediglich einen Prozentsatz von 50—65% der Gesamtproteine ausmachen (GRANICK 1938, HANSON 1941, WILDMAN und JAGENDORF 1952 u. a.). Wenn also z. B. WILDMAN und BONNER (1947) angeben, daß sie mehr als 70% der „Cytoplasmaproteine" isolieren konnten, so ist das gleichbedeutend mit der Angabe, daß unter den von ihnen gewählten Versuchsbedingungen rund 40% der gesamten Zellproteine in Lösung gehen. Auf die Zahl der aufgeschlossenen Zellen bezogen, wird dieser Prozentsatz etwas günstiger, doch bleibt er weit hinter den mit der LUGGschen Methode erzielbaren Ausbeuten zurück.

Wenn mit der Acetontrockenpulver-Methode mehr als 80% der gesamten Zellproteine (bezogen auf die Gesamtmenge der verarbeiteten Blattmasse) in Lösung gebracht werden können, so ist damit eine Ausbeute erreicht, die bisher nur mit der LUGGschen Methode erzielt werden konnte[1]. Während aber die Boratpuffer-Äthanol-Äther-Mischung die Zellproteine denaturiert, läßt sich die Trockenpulver-Methode so gestalten, daß man zu nativen Präparaten (s. o.) kommt. Sie dürfte damit den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren — zumindest für gewisse Fragestellungen — überlegen sein.

Dennoch bleibt zu betonen, daß man Eiweißpräparate erst dann als „repräsentativ für die Gesamtproteine" bezeichnen sollte, wenn wirklich 100% der Zelleiweiße in Lösung gebracht werden können. So lange im Organbrei oder Trockenpulver noch Eiweißreste zurückbleiben, läßt sich nicht ausschließen, daß nicht einzelne Fraktionen bevorzugt zurückgehalten werden und damit eine falsche Zusammensetzung der Zellproteine vorgetäuscht wird. Bis das Ziel einer restlosen Proteinextrak-

[1] Die Extraktion pflanzlichen Materials mit ungepufferten Basen (CROOK 1946) ist sicherlich nur in Einzelfällen anwendbar.

tion methodisch erreicht ist, bleibt nur der in der vorliegenden Arbeit eingeschlagene Weg einer sorgfältigen Standardisierung des Aufarbeitungs- und Trennungsganges.

b) Bausteinanalyse der Blattproteine.

Nach anfänglicher Verwendung der sog. „PARTRIDGE-Mischung" (n-Butanol-Eisessig-Wasser 40:10:50, PARTRIDGE 1948) wurde nach Gemischen gesucht, die eine klarere Trennung der im Hydrolysat der *Kalanchoë*-Proteine vorliegenden Aminosäuren gewährleisten. Nach Prüfung von mehr als 100 Lösungsmittelkombinationen kristallisierten sich als besonders geeignet heraus: Pyridin-Amylalkohol-Wasser-Gemische verschiedener Zusammensetzung (vgl. auch HEYNS und WALTER 1951), n-Butanol-Eisessig-Wasser 68:5:27 (besonders geeignet zur Trennung von Leucin und Isoleucin) sowie ganz besonders eine veresterte n-Butanol-Ameisensäure-Wasser-Mischung 12:2:7[1], die sich von der von WIGGINS und WILLIAMS (1952) angegebenen Mischung durch ihren höheren Säuregrad unterscheidet. Diese Lösungsmittelkombination, die bereits im eindimensionalen Chromatogramm eine ausgezeichnete Auftrennung der vorliegenden Komponenten — bei gleicher Reihenfolge wie im PARTRIDGE-Gemisch — ergibt, wurde für sämtliche Hauptversuche benutzt.

In den ersten Versuchsreihen wurde ausschließlich mit eindimensionaler Trennung gearbeitet. Durch die Benutzung jeweils mehrerer Lösungsmittelgemische konnten insgesamt 23 ninhydrinpositive Substanzen aufgefunden werden; von diesen lag eine nur im basischen Hydrolysat vor. Später wurden dann auch zweidimensionale Chromatogramme angesetzt, die aufsteigend mit der von TURBA (1954) angegebenen Zusammenstellung sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser 75:13:12/Methyläthylketon-Pyridin-Wasser 70:15:15, absteigend mit der von PFENNIG (1954) angegebenen Kombination n-Butanol-Eisessig-Wasser 40:10:50/α-Picolin-Eisessig-Wasser 75:2:23 getrennt wurden. Dabei ließ sich noch eine weitere, sehr schwach angefärbte Komponente erfassen, so daß damit insgesamt 24 ninhydrinpositive Hydrolyseprodukte aufgefunden wurden.

[1] Diese Mischung wird folgendermaßen angesetzt: 12 Teile n-Butanol werden mit 2 Teilen Ameisensäure (98—100%) und 1 Teil Aqua bidest. eine Stunde lang am Rückflußkühler gekocht. Die noch heiße Mischung wird dann mit 6 Teilen Aqua bidest. versetzt und anschließend für einige Minuten intensiv geschüttelt. Man füllt dann in einen Scheidetrichter um und bringt diesen zur Trennung der beiden Phasen in den Chromatographieraum. Nach 24 Std benutzt man die untere Phase zur Sättigung der Atmosphäre in der Chromatographiekammer, die obere zur chromatographischen Trennung.

Die Identifizierung wurde sowohl auf Rundfiltern als auch auf zweidimensionalen Chromatogrammen vorgenommen. Zum Nachweis der Aminosäuren wurden neben dem Ninhydrin-Reagens noch Natrium-β-naphthochinonsulfonat und Isatin angewandt. *Nach Vergleich aller Analysen ließen sich schließlich mit Sicherheit folgende Aminosäuren identifizieren:* Cystin[1], Histidin, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glykokoll, Serin, Glutaminsäure, Threonin, α-Alanin, Prolin, Tyrosin, Tryptophan, Valin, Methionin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin. Das Vorkommen von Oxyprolin konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Diese Iminosäure, die auch FOWDEN (1952a, b, 1954) sowie YEMM und FOLKES (1953) in ihren Analysen nicht aufführen, wollen SISAKJAN, BEZINGER und KUVAEVA (1951) im Chloroplasteneiweiß aufgefunden haben. Dafür aber traten regelmäßig 6 weitere ninhydrinpositive Substanzen auf, die zunächst dem von CRUMPLER und DENT (1949) ausgearbeiteten Kupfertest auf α-Aminosäuren unterworfen wurden. Soweit die bisherigen Versuche schon einen Schluß zulassen, scheint es sich bei allen 6 Komponenten um α-Aminosäuren bzw. N-substitutierte α-Aminosäuren zu handeln. Eine davon liegt nach Auftrennung mit dem PARTRIDGE-Gemisch zwischen den Hexonbasen und der Asparaginsäure, die zweite, die zur Doppelfleckbildung (vgl. STEWARD und THOMPSON 1950) zu neigen scheint, liegt zwischen dem Prolin und dem Tyrosin, während die übrigen 4 Komponenten in dem verwendeten n-Butanol-Ameisensäure-Wasser-Gemisch (und ebenso in der PARTRIDGE-Mischung) noch über das Leucin hinauswandern. Ihre Identifizierung steht noch aus; sie sollen vorläufig als „*Transleucine*" bezeichnet werden[2].

B. Die Veränderungen der Zelleiweiße während der photoperiodischen Induktion.

Die Gegenüberstellung von Chromatogrammen aus rein vegetativer *Kalanchoë* mit solchen aus — mindestens eine Woche hindurch — photoperiodisch induzierten Exemplaren ergab — wie kaum anders zu erwarten — die qualitative Übereinstimmung der Bausteine. Eine halbquantitative Konzentrationsabschätzung über die Fleckengröße (vgl. FISHER, PARSONS und MORRISON 1948) ließ aber erkennen, daß *mindestens eine der Komponenten deutlich vermehrt* ist (METZNER 1954a). Diese Komponente ließ sich als Tyrosin identifizieren. Es war von vornherein wahrscheinlich, daß auch einige andere Aminosäuren in veränderter Konzentration vorliegen; allein die Ungenauigkeit der

[1] Cystin läßt sich erst nach Oxydation des Hydrolysats mittels Wasserstoffperoxyd sicher erfassen (DENT 1947).

[2] „Transleucine" treten (nach Mitteilung von Herrn Dr. N. PFENNIG, Mikrobiologisches Institut der Universität Göttingen) auch in Bakterienhydrolysaten auf. Über ihre chemische Natur lassen sich bisher noch keine Angaben machen.

angewandten Auswertungsmethode ließ keine weiteren Differenzen erfassen. So blieb nur der Weg einer möglichst genauen quantitativen Bausteinanalyse, die aber andererseits einen für Serienuntersuchungen tragbaren Aufwand nicht überschreiten durfte.

Dem Ausfall einiger Kontrollchromatogramme nach zu urteilen, laufen im Vegetationspunkt und den jüngsten Blattwirteln andere Prozesse ab als in den älteren Laubblättern. Für die bearbeitete Fragestellung waren nun die Vorgänge am Vegetationspunkt weitaus interessanter, zumal sich hier ja die eigentlichen Differenzierungsprozesse abspielen. So wurde die *Untersuchung der Proteinänderungen auf die jüngsten Blattetagen beschränkt;* die in den alten Blättern ablaufenden Prozesse bedürfen einer eigenen Bearbeitung. Die für die rein qualitative Analyse (Teil A dieser Arbeit) entwickelte Methodik mußte für quantitative Zwecke einige Erweiterungen erfahren, so daß sich schließlich folgender verfeinerter Arbeitsgang ergab:

I. Methodik.

Da nur unter völlig gleichen Bedingungen gewonnene Chromatogramme quantitativ miteinander verglichen werden dürfen (FISCHER und DÖRFEL 1953), wurden die einzelnen Proben auf einem in 12 Einzelstreifen unterteilten Chromatographiebogen (Schleicher & Schüll 2043 b Mgl) aufgetragen, wobei die aufpipettierten Mengen zwischen den Extremen 50 und 1000 γ Aminosäure variiert wurden. Zur endgültigen Messung wurden nur Streifen ausgewählt, deren intensivste Flecken maximale Extinktionen zwischen 1,0 und 1,4 zeigten. In diesem Falle sind auch die schwächsten Banden noch mit hinreichender Genauigkeit meßbar, ohne daß die einzelnen Komponenten allzusehr zusammenlaufen.

Die Anfärbung erfolgte bei den quantitativen Versuchen nicht mit dem üblichen Ninhydrin-Reagens (s. o.), sondern durch eine 0,2%ige Lösung dieser Substanz in 96%igem Äthanol (siehe auch ÅKERFELD 1954). Nach PATTON und CHISM (1951) sollen sich mit diesem Sprühreagens besser reproduzierbare Werte ergeben.

Sogleich nach der Farbentwicklung und Trocknung wurden die Einzelstreifen in 1,2 cm breite Bänder zerschnitten, die dann zur photometrischen Messung (s. u.) herangezogen wurden.

Die quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen ist im Laufe der letzten Jahre von mehreren Seiten versucht worden. Dabei erwiesen sich verschiedene Wege als möglich. So lösen einige Autoren die einzelnen Aminosäuren nach schwacher Anfärbung (zur Markierung der Zonen) aus der Papierfaser heraus, um den quantitativen Nachweis dann in freier Lösung zu führen (LANDUA und AWAPARA 1949, BOISSONNAS 1950 u. a.), andere werten die Intensität der Färbung unmittelbar auf dem Chromatographiestreifen aus (ROCKLAND und DUNN 1949, BLOCK 1950, ROCKLAND, BLATT und DUNN 1951, BRÜGGEMANN und DREPPER 1952, REDFIELD und BARRON 1952 u. a.). Enthält das Hydrolysat nur wenige Komponenten — z. B. bei der Untersuchung von Peptiden —, so ist die erste Methode zweifellos vorzuziehen. Muß man aber mit einer größeren Anzahl von Bausteinen rechnen, so wird das Zerschneiden der Streifen sehr unsicher. Erhöht man die Trennschärfe durch Arbeiten mit sehr langen Streifen und, dadurch bedingt, großen Laufzeiten, so werden die durch Adsorption an der Faser bedingten Verluste untragbar groß. Es bleibt dann nur die Möglichkeit, jedes Hydrolysat in ver-

schiedenen Lösungsmittelgemischen zu chromatographieren und die Zusammensetzung aus dem Vergleich der gesamten Einzelmessungen zu errechnen. Dieser Weg ist zwar prinzipiell möglich, für Serienuntersuchungen und Analysen kleinster Substanzmengen jedoch ungeeignet.

Aus diesem Grunde erfolgte die Auswertung der Ninhydrinfärbung direkt auf dem Papier. Zunächst wurden, in Anlehnung an eine von Bode, Hübener, Brückner und Hoeres (1952) publizierte Arbeit, die Ninhydrinreaktionsprodukte in die beständigeren Kupferkomplexe umgewandelt. Leider aber ließ sich die in jener Veröffentlichung aufgestellte Behauptung, daß beim Arbeiten mit den Kupferkomplexen eine für nahezu alle Aminosäuren (Ausnahmen: Tyrosin und Cystin) einheitliche Eichkurve zugrunde gelegt werden darf, nicht bestätigen (vgl. auch Fischer und Dörfel 1953). Ob die später von Mortreuil und Khouvine (1954) beschriebenen Cadmiumkomplexe diesen Vorteil tatsächlich besitzen, bleibt abzuwarten. So wurde schließlich zur Auswertung der Ninhydrinfärbung selbst übergegangen. Die einzelnen Komponenten färben sich zum Teil sehr verschieden an, zeigen aber — von den Iminosäuren abgesehen — erstaunlicherweise ein übereinstimmendes Absorptionsmaximum bei 570 mμ (vgl. Thompson, Zacharias und Steward 1951). Nur ist die Extinktion äquimolarer Mengen der einzelnen Aminosäuren nicht nur nicht gleich, die Verhältniszahlen sind überdies noch konzentrationsabhängig, so daß eine komplizierte Eichung unumgänglich ist.

Die Intensität der Aminosäureflecken kann im durchfallenden (Block 1950 u. a.) und im reflektierten Licht (Turba 1954 u. a.) gemessen werden. Viele Autoren haben die *Durchlässigkeit* (in Prozent) bestimmt, doch ist zu bedenken, daß zwischen Durchlässigkeit und Konzentration keine einfache Beziehung existiert, so daß eine Umrechnung bzw. Umzeichnung der erhaltenen Kurvenzüge erforderlich wird. Soforn das betreffende Auswertegerät dies gestattet, ist es daher vorteilhafter, sogleich die *Extinktion* zu messen und dann das Flächenintegral der Extinktionskurve der Substanzmenge gegenüberzustellen.

In den nachstehend beschriebenen Versuchen wurde die unmittelbare Extinktionsmessung mit Hilfe eines Zeissschen Spektralphotometers durchgeführt. Dazu wurde der normale Schlitten zur Halterung der Küvetten entfernt und durch einen Spezialschlitten ersetzt, der den Meßstreifen zwischen zwei planparallelen Glasplatten aufnimmt. Der Vorschub dieses Schlittens wurde über eine Mikrometerschraube geregelt, die eine kontinuierliche Bewegung der Chromatogramme ermöglichte. Die Extinktion der Streifen wurde in Abständen von jeweils 0,5 mm bestimmt. Dabei lagen die Spaltbreiten normalerweise zwischen 0,6 und 0,7 mm[1]. Damit ist eine lückenlose Abtastung des gesamten Chromatogramms möglich. Wertet man von jedem Chromatogramm, so wie in sämtlichen Hauptversuchen, drei je 1,2 cm breite Längsstreifen aus[2], so gelangt man für jedes eindimensionale Chromatogramm zu mehr als 2000 Einzelmessungen[3].

[1] Die Spaltbreite läßt sich noch bedeutend verringern, wenn die Papierstreifen zuvor mit einer geeigneten Immersionsflüssigkeit getränkt werden (vgl. Hiller, Zinnert und Frese 1952). Es wurden mehrere Vergleichsmessungen mit Anisol durchgeführt. Es zeigte sich aber, daß sehr leicht kleine Luftblasen eingefangen werden, so daß man einen schlechteren Nullwert erhält als beim Arbeiten mit trockenen Papieren.

[2] Da der Spalt des Spektralphotometers nur eine Höhe von 10 mm besitzt, wird, streng genommen, nur das 1 cm breite Mittelfeld der einzelnen Streifen erfaßt.

[3] Als Nullwert diente jeweils die Extinktion des ungefärbten Chromatographiepapiers.

Sämtliche Meßwerte wurden auf Millimeterpapier übertragen; auf diese Weise erhält man Kurvenzüge, deren Flächenintegrale sich zu den vorliegenden Substanzmengen in Beziehung setzen lassen. Eine Laufstrecke von 35—40 cm reicht jedoch nicht aus, um alle Komponenten des *Kalanchoë*-Hydrolysats völlig voneinander zu trennen. Die gemessenen Extinktionskurven sind daher durch die Überlagerung symmetrischer (REDFIELD und BARRON 1952) Einzelkurven zu erklären.

Die graphische Zerlegung dieser Kurvenzüge in einzelne Gauss-Kurven ist durchaus möglich (vgl. Abb. 2). Man geht dazu von dem nicht durch Überlagerung gestörten Ast einer zusammengesetzten Kurve aus und bestimmt zunächst durch Anlegen der Tangenten (am zweckmäßigsten mittels eines Glaslineals) den Wendepunkt, dessen Ordinate mit y_w bezeichnet werden möge. Berücksichtigt man nun, daß die Ordinate des Maximums einer Gauss-Kurve um den Faktor $^5/_3$ größer ist

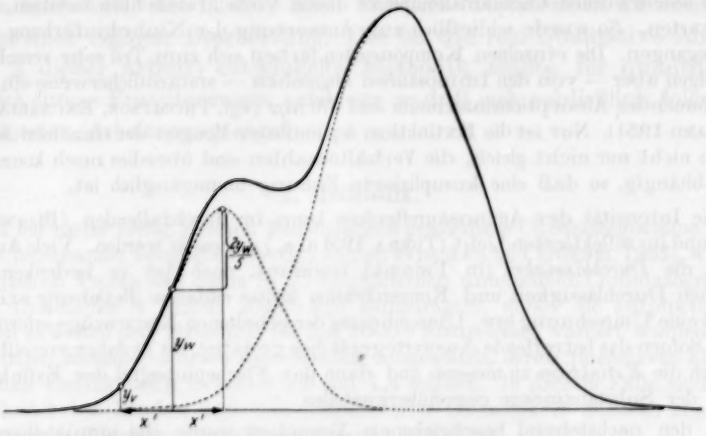


Abb. 2. Zerlegung einer Extinktionskurve in zwei Gauss-Kurven (Erklärungen siehe im Text.)

als die des Wendepunktes (vgl. WITTING 1944) und daß andererseits der seitliche Abstand zwischen dem Wendepunkt und dem Maximum ebenso groß ist wie zwischen dem Wendepunkt und der Ordinate $y_v = \frac{y_w}{5}$ (vgl. z. B. KOLLER 1943), so läßt sich die Lage des Maximums genau angeben. Der zweite Schenkel der Kurve ergibt sich dann einfach durch spiegelbildliche Übertragung des ersten; durch Differenzbildung erhält man eine Restkurve, die, falls selbst noch zusammengesetzt, in gleicher Weise weiter zerlegt werden kann.

Diese Aufgliederung in Einzelkurven ist außerordentlich umständlich und zeitraubend. Aus diesem Grunde wurden die erhaltenen Photometerkurven auch nur zu einem Teil nach dem eben beschriebenen Verfahren zerlegt. In der Regel wurden die Gauss-Kurven statt dessen durch flächengleiche gleichschenklige Dreiecke approximiert. Sofern zwischen den einzelnen Banden ausgeprägte „Täler" und nicht nur „Schultern" auftreten, ist auch das von REDFIELD und BARRON (1952) ausgearbeitete Verfahren anwendbar. Die Einzelkurven wurden mit einem Polarplanimeter graphisch integriert.

Besonders schwierig ist die Auftrennung sehr eng benachbarter Komponenten, besonders dann, wenn beide in sehr verschiedener Menge vorliegen. Um die Analysenwerte nicht mit unnötigen Fehlern zu belasten, wurde daher auf die Trennung solcher Paare verzichtet. Statt dessen wurden „Gruppen" ausgewertet, und zwar:

1. Lysin + Histidin + Cystin, 2. Arginin, 3. Asparaginsäure + Glykokoll + Serin, 4. Glutaminsäure + Threonin, 5. α-Alanin, 6. Prolin, 7. Tyrosin, 8. Valin + Methionin, 9. Phenylalanin, 10. Leucin + Isoleucin, 11. „Transleucine" a—d. Auf die quantitative Bestimmung des Tryptophans wurde verzichtet, ebenso auf die der beiden neben den „Transleucinen" noch aufgefundenen (nur in Spuren vorhandenen) unbekannten Komponenten.

Es mußten nun Eichkurven aufgenommen werden, die es gestatten, dem ermittelten Planimeterwert (= Flächenintegral der Extinktionskurve) die Menge der betreffenden Aminosäure zuzuordnen. Diese Kurven wurden folgendermaßen gewonnen:

Von allen im Hydrolysat aufgefundenen Aminosäuren bzw. deren Hydrochloriden wurden — soweit Lösungen entsprechender Konzentration überhaupt

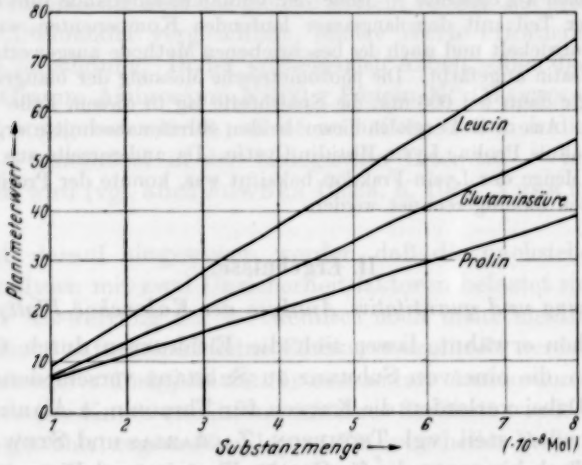


Abb. 3. Eichkurven für drei verschiedene Aminosäuren.

möglich — m/50 Lösungen angesetzt. Von diesen — bzw. entsprechend verdünnteren Stammlösungen — ausgehend, wurden die Verdünnungsstufen m/100, m/500 und m/2500 hergestellt, von denen mittels Schmelzpunktsröhrchen genau abgemessene Volumina auf Chromatographiepapier übertragen wurden. Die aufgebrachten Mengen wurden durch Differenzwägung der vollen und leeren Pipette bis auf 0,02 mg genau ermittelt. Dabei mußte der Durchmesser der aufgetragenen Flecken kleiner als 1 cm (Spalthöhe des Spektralphotometers) gehalten werden. Die getrockneten Papierstreifen wurden bis zur Aufnahme des Planimeterwerts genau wie normale Chromatogramme weiterbehandelt.

Die Eichkurven wurden so angelegt, daß den ermittelten Planimeterwerten die jeweils aufgetragenen Aminosäuremengen gegenüberstehen, wobei die Substanzmengen in molarem Maß angegeben wurden. Auf diese Weise erhält man, den vier verwendeten Konzentrationsstufen entsprechend, für jede Aminosäure vier verschiedene Eichkurven, die in dem in den Chromatogrammen vorliegenden Bereich (etwa 10^{-7}—10^{-8} Mol) hinreichend genau durch Gerade approximiert werden können (Abb. 3).

Die Benutzung dieser Eichkurven bei der Auswertung von „Gruppen" bedarf besonderer Festsetzungen: Im Falle der Bande Lysin-Histidin-Cystin wurde der Auswertung die Eichkurve für das Lysin zugrunde gelegt, zumal sich die Kurven

für die beiden basischen Aminosäuren nur wenig unterscheiden und das an der Gesamtabsorption nur sehr schwach beteiligte Cystin praktisch vernachlässigt werden kann. Im Falle der Banden Glutaminsäure-Threonin, Valin-Methionin und Leucin-Isoleucin wurde jeweils die Eichkurve der ersten, mengenmäßig wesentlich stärker ins Gewicht fallenden Substanz gewählt. Eine Mittelwertkurve wurde nur für die Bestimmung der Fraktion Asparaginsäure-Glykokoll-Serin gebildet, da in diesem Falle die einzelnen Komponenten in annähernd gleicher Menge vorliegen. In einer derartigen Auswertung komplexer Banden liegt zwar ein gewisser Unsicherheitsfaktor, der aber nicht größer sein dürfte als der Fehler, der mit einer weiteren graphischen Auflösung der „Gruppen" verbunden sein würde.

Neben den eigentlichen Chromatogrammen wurden jeweils noch einige Vergleichsbogen angesetzt, die nach dem Trocknen in der — aus gleich behandelten Kontrollstreifen abgelesenen — Höhe der Glutaminsäurebande durchgeschnitten wurden. Der Teil mit den langsamer laufenden Komponenten wurde mittels Ninhydrin entwickelt und nach der beschriebenen Methode ausgewertet; der Rest wurde mit Isatin angefärbt. Die photometrische Messung der blaugrünen Prolinbande erfolgte dann bei 605 mμ; die Spaltbreite lag in diesem Falle zwischen 0,1 und 0,2 mm. Aus dem Vergleich dieser beiden Streifenabschnitte ergab sich das Mengenverhältnis Prolin : Lysin-Histidin-Cystin. Da andererseits aus den Hauptstreifen die Menge der Lysin-Fraktion bekannt war, konnte der Prolinwert in die Analysendaten hineingerechnet werden.

II. Ergebnisse.

a) Eichung und quantitative Analyse der Kalanchoë-Blattproteine.

Wie schon erwähnt, lassen sich die Eichkurven durch Gerade approximieren, die eine von Substanz zu Substanz verschiedene Steigung besitzen. Dabei verlaufen die Kurven für Threonin, α-Alanin und Glykokoll besonders steil (vgl. THOMPSON, ZACHARIAS und STEWARD 1951), besonders flach hingegen die für Cystin, Tyrosin und Phenylalanin. Es bleibt aber zu betonen, daß die Steigungen sich nur über ein relativ begrenztes Intervall (Mengenverhältnis etwa 1:8) hin durch Gerade wiedergeben lassen; die Neigung schwankt außerordentlich stark mit der Flächenkonzentration der Aminosäuren, die in den Versuchsreihen zur Aufnahme der Eichkurven zwischen 10^{-7} und 10^{-8} Mol/cm² variiert wurde.

Legt man auf exakte Mengenangaben der einzelnen Komponenten Wert, so bleibt zunächst die — der Flächenkonzentration der Komponenten proportionale — „*Farbkonzentration*" (= Flächenintegral der Extinktionskurve/Fläche der Farbzone) zu ermitteln; der Auswertung muß dann jeweils die passende Eichkurve zugrunde gelegt werden. Die quantitative Auswertung auf dem Papier wird dadurch umständlicher als in freier Lösung. Ohne Berücksichtigung dieser Erkenntnisse muß man aber mit sehr fehlerhaften Ergebnissen rechnen. In der Praxis läßt sich jedoch durch entsprechende Wahl der aufgetragenen Hydrolysatmengen (s. o.) fast stets erreichen, daß man alle Komponenten mit der Kurvenschar für ein und dieselbe mittlere Flächenkonzentration aus-

werten darf. In den vorliegenden Versuchen lag dieser Wert in der Regel zwischen 10^{-7} und 10^{-8} Mol/cm^2.

Die Eichkurven lassen nun jeden ermittelten Planimeterwert in eine Aminosäuremenge (im molaren Maß) umrechnen. Addiert man die insgesamt erhaltenen Daten, so erhält man die *Gesamtmenge der ninhydrinpositiven Substanzen*, auf die nun jeder Einzelwert bezogen werden kann. So gelangt man zu Verhältniszahlen, die das (molare) Mengenverhältnis der einzelnen Aminosäuren recht anschaulich wiedergeben (s. Tabelle 1).

Bedauerlicherweise werden die Ergebnisse von Eiweißanalysen in der Literatur noch immer auf sehr verschiedene Bezugsgrößen berechnet. Daher sind oftmals die über das gleiche Protein veröffentlichten Analysen gar nicht miteinander vergleichbar; andere Werte erfordern eine zeitraubende Umrechnung. In der vorliegenden Arbeit sollen die Analysendaten in „Gramm Aminosäure-N/100 g Protein-N" (Martin und Synge 1945 u. a.) angegeben werden; es ist zu hoffen, daß sich diese Berechnungsart — zumindest in der biologischen Literatur — immer mehr durchsetzen wird (vgl. auch Fowden 1952a, b, 1954, Yemm und Folkes 1953).

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die nachstehend aufgeführten Analysen mit zwei Unsicherheitsfaktoren belastet sind: Einmal konnte zur Auswertung der — chemisch noch nicht identifizierten — „Transleucine" naturgemäß keine Eichkurve ermittelt werden. Es blieb also nichts anderes übrig, als die für eine andere Aminosäure aufgenommene Kurve (als Kurve annähernd mittlerer Steilheit wurde die Leucin-Eichkurve gewählt) zugrunde zu legen. Ein eventueller Fehler würde sich prozentual auf alle vorhandenen Komponenten übertragen. Zum zweiten sind keine Korrekturen für mögliche Adsorptionsverluste während der Trennung (Fischer und Dörfel 1953) angebracht worden. Für die bearbeitete Fragestellung braucht aber den Absolutwerten kein besonderes Gewicht beigemessen zu werden; daher können beide Fehler auch als unbedenklich in Kauf genommen werden, zumal sie die beobachteten Relativschwankungen (s. u.) nicht verfälscht haben können.

Die Tabelle 1 gibt die quantitative Aminosäurezusammensetzung der *Kalanchoë*-Blattproteine (Blätter der Spitzenregion, s. o.) wieder. Dabei ist jede Zahl als Mittelwert aus drei getrennt voneinander aufgearbeiteten Hydrolysaten des gleichen Trockenpulvers gewonnen worden; das Pflanzenmaterial war 6 Monate lang unter Langtagbedingungen kultiviert und im Mai geerntet worden. Zur photometrischen Messung war dann jedes Chromatogramm in drei Einzelstreifen zerlegt worden (s. o.).

Aus dem Vergleich der Einzelwerte erhält man zugleich eine Vorstellung von der *Reproduzierbarkeit der Messungen:* Für die in der Tabelle 1 angeführten Daten ergab sich ein mittlerer Fehler von durch-

Tabelle 1. *Aminosäurezusammensetzung vegetativer Kalanchoë-Sproßspitzen* (Mittelwerte aus drei Meßreihen[1].)

Aminosäure	Mol Aminosäure / 100 Mol ninhydrinpositive Substanz	g Aminosäure-N / 100 g Protein-N
Lysin-Histidin-Cystin	10,0	15,9
Arginin	16,1	25,5
Asparaginsäure-Glykokoll-Serin	7,9	6,3
Glutaminsäure-Threonin	7,4	5,9
α-Alanin	7,5	5,9
Prolin	5,1	4,0
Tyrosin	7,1	5,6
Valin-Methionin	9,8	7,8
Phenylalanin	5,4	4,3
Leucin-Isoleucin	13,1	10,4
„Transleucine"	10,6	8,4

[1] Ohne Berücksichtigung des Tryptophans.

schnittlich 8,7 (± 1,9)%. Das ist gleichbedeutend mit der Feststellung, daß die Einzelmessungen mit einem mittleren Fehler von etwa 15% belastet sind. Dieser Wert berücksichtigt aber nicht allein die photometrische Messung, sondern alle Arbeitsgänge von der Weiterverarbeitung des Acetontrockenpulvers bis zum Vergleich des Planimeterwerts mit der Eichkurve.

In Tabelle 2 sind die für die *Kalanchoë*-Eiweiße erhaltenen Werte einigen bereits in der Literatur veröffentlichten Analysen pflanzlicher Zellproteine gegenübergestellt; unvollständige Analysen (vgl. LUGG 1949) blieben dabei unberücksichtigt. Ein Vergleich läßt erkennen, daß im *Kalanchoë*-Zelleiweiß mehrere Aminosäuren in nahezu gleicher Menge

Tabelle 2. *Aminosäurezusammensetzung der Zellproteine verschiedener Pflanzenarten.* (Meßwerte in g Aminosäure-N/100 g Protein-N[1].)

Aminosäure	*Kalanchoë*	*Hordeum*[2]	*Chlorella*[3]	*Anabaena*[3]
Lysin-Histidin-Cystin	15,9	11,4	13,7	9,1[4]
Arginin	25,5	15,0	15,8	11,7[4]
Asparaginsäure-Glykokoll-Serin	6,3	16,4	15,9	14,8
Glutaminsäure-Threonin	5,9	12,0	10,7	11,3
α-Alanin	5,9	8,0	7,7	6,0
Prolin	4,0	4,0	5,8	5,0
Tyrosin	5,6	2,2	2,8	1,6[4]
Valin-Methionin	7,8	6,3	6,9	8,2
Phenylalanin	4,3	3,2	2,8	2,9
Leucin-Isoleucin	10,4	10,5	9,6	10,1
„Transleucine"	8,4	—	—	—

[1] Ohne Berücksichtigung des Tryptophans.
[2] Nach YEMM und FOLKES (1953).
[3] Nach FOWDEN (1954).
[4] Werte vom Autor selbst als wahrscheinlich zu niedrig angegeben.

wie im Gerstenprotein oder den Zelleiweißen von *Chlorella* und *Anabaena* vorliegen. Einzelne Abweichungen aber liegen weit außerhalb der Fehlergrenze der Methode. Diese betreffen die wesentlich höheren Werte für das Arginin und die cyclischen Aminosäuren (Tyrosin und Phenylalanin) sowie — etwas weniger deutlich — für die beiden anderen Hexonbasen (Lysin und Histidin) bei gleichzeitiger Abnahme der Aminodicarbonsäuren (Glutamin- und Asparaginsäure).

Leider liegen — von einer Arbeit von PEARSALL (1949) und den rein qualitativen Angaben ALLSOPPs (1948) abgesehen — noch keine Untersuchungen meristematischer Gewebekomplexe vor[1]. Mancherlei Befunde, u. a. die zugunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation (PEARSALL 1949), sprechen aber dafür, daß den in aktivem Teilungswachstum befindlichen Geweben ein erhöhter Nucleoproteidgehalt zukommt. Da der Pflanzenzelle Protamine fehlen (vgl. ACKERMANN und Mitarbeiter 1951), dürften deren Eiweißkomponenten — zumindest in ihrer überwiegenden Menge — zu den Histonen zu rechnen sein. Diese primitiven Eiweiße sind aber gerade durch einen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren und relativ große Tyrosinmengen gekennzeichnet. So liegen die Tyrosinwerte sowohl für menschliches Lebergewebe (SBARSKI und DEBOW 1952) als auch für das Thymushiston (vgl. LEHNARTZ 1947) über 5%, während die Argininkomponente der Histone 25%, Lysin und Histidin zusammen 20% erreichen können (ACKERMANN und Mitarbeiter 1951). Umgekehrt fehlt im Histon der menschlichen Leber die Asparaginsäure völlig; in anderen Histonen sind beide Aminodicarbonsäuren sowie deren Begleiter (Glykokoll, Serin und Threonin) nur in Spuren nachweisbar.

Die Abweichungen der *Kalanchoë*-Zellproteine sind demnach ohne weiteres verständlich, wenn man von der durchaus wahrscheinlichen Annahme ausgeht, daß in der meristematischen Spitzenregion (Vegetationspunkt und jüngste Blattwirtel) ein höherer Gehalt an Nucleoproteiden vorliegt. Diese Ansicht wird noch gestützt durch den interessanten Befund von PEARSALL (1949), wonach bei *Beta vulgaris* var. *cicla* die Proteine der jüngsten Blätter einen höheren Anteil an basischen Aminosäuren aufweisen als die älteren Blätter.

b) Veränderungen der Zelleiweiße im Verlaufe der Induktion.

Zur Untersuchung der Eiweißveränderungen während des Induktionsprozesses wurden 9 Monate alte, im natürlichen Langtag des April (Tageslänge einschl. Dämmerung etwa 15 Std) gehaltene Pflanzen in ein

[1] *Nachtrag während der Korrektur:* Die kürzlich von M. KESER [Planta (Berl.) **45**, 273 (1955)] veröffentlichten Untersuchungen bringen ebenfalls nur grobe Abschätzungen der in meristematischen und ausdifferenzierten Geweben auftretenden freien und im Eiweiß gebundenen Aminosäuren.

Dunkelzelt verbracht und dort einem 9:15-Std-Tag ausgesetzt, wobei die Beleuchtung ausschließlich durch Tageslicht erfolgte. Vom 1. bis 8. Induktionstag wurden täglich 5 Pflanzen entnommen, deren obere vier Wirtel, wie beschrieben, weiterverarbeitet wurden. In den (einschl. eines voraufgehenden Langtags) 9 Tagen des Versuchs betrug die mittlere Sonnenscheindauer 11 Std (Extremwerte 4,5 und 13,5 Std); das Tagesmittel der Außentemperatur lag bei 9° C. Durch zusätzliche Heizung wurde die Temperatur im Gewächshaus aber tagsüber bei etwa 18° C, nachts bei 15—16° C gehalten (s. o.).

Unter Gewächshausbedingungen sind die Pflanzen aber trotz aller Vorsichtsmaßregeln doch gewissen Schwankungen der Außenfaktoren ausgesetzt, so daß Verschiebungen in der Zusammensetzung der Blatteiweiße nicht ausgeschlossen werden können. Weiterhin mußte von vornherein damit gerechnet werden, daß die von einem zum andern Tag ablaufenden Veränderungen in ihrer Amplitude innerhalb der Fehlergrenze der Methode (15%, s. o.) bleiben. Um dennoch den Gang solcher möglicher Veränderungen erfassen zu können, wurden die aufgenommenen Kurven nach einem in der Angewandten Mathematik gebräuchlichen Verfahren (vgl. z. B. v. SANDEN 1948) geglättet. Dazu wurden jeweils die Meßwerte für drei aufeinanderfolgende Tage zu einem Mittelwert vereinigt. Der für den 1. Induktionstag angeführte Wert ist damit in Wahrheit der Mittelwert der Messungen der Kontrolle sowie des 1. und 2. Induktionstages, der Wert für den 2. Induktionstag der Mittelwert der Einzeldaten für die ersten drei Induktionstage usw. So ergaben sich die Werte der Tabelle 3.

Anschaulicher ist die graphische Darstellung (Abb. 4 und 5). Man erkennt, daß es im wesentlichen zwei Reaktionstypen gibt: Die erste

Tabelle 3. *Aminosäurezusammensetzung der Kalanchoë-Proteine im Verlaufe mehrtägiger photoperiodischer Induktion.* (Meßwerte in g Aminosäure-N/100 g Protein-N[1])

Aminosäure	Induktionstag						
	1	2	3	4	5	6	7
Lysin-Histidin-Cystin	15,9	15,3	16,3	18,0	17,7	17,3	15,6
Arginin	21,9	20,4	20,8	21,2	20,8	19,0	18,1
Asparaginsäure-Glykokoll-Serin	6,8	7,2	7,1	8,5	8,1	8,9	7,4
Glutaminsäure-Threonin	6,7	6,3	6,3	6,6	7,3	6,1	5,3
α-Alanin	6,8	6,3	6,1	6,8	6,7	6,5	5,7
Prolin	4,6	4,5	4,4	3,4	4,4	4,5	4,8
Tyrosin	5,2	5,6	6,1	6,0	5,9	5,6	5,7
Valin-Methionin	8,1	8,7	8,0	6,4	6,4	7,4	10,1
Phenylalanin	3,9	3,4	3,3	3,2	3,1	3,4	3,7
Leucin-Isoleucin	11,2	12,5	12,1	11,4	10,3	10,7	11,7
„Transleucine"	8,9	9,8	9,5	8,4	9,1	10,5	11,8

[1] Ohne Berücksichtigung des Tryptophans.

Gruppe von Aminosäuren, zu der neben dem Leucin und dem Valin noch die „Transleucine" und — weniger typisch — Prolin und Tyrosin zu rechnen sind, nimmt zunächst in ihrer Konzentration zu, fällt dann ab und durchläuft zwischen dem 4. und 5. Induktionstag ein Minimum, nach dem sie wieder ansteigt. Umgekehrt verhält sich eine aus α-Alanin, Lysin, Glutaminsäure und — weniger typisch — Arginin und Asparaginsäure zusammengesetzte Reihe, die zunächst eine Depression erleidet, darauf — ebenfalls zwischen dem 4. und 5. Tag — ein Maximum durchläuft und dann wieder abnimmt. Die Abb. 4 und 5 zeigen als typische Vertreter dieser beiden Reihen Leucin, Valin und die „Transleucine" auf der einen (Abb. 4), α-Alanin, Lysin und Glutaminsäure auf der anderen Seite[1] (Abb. 5).

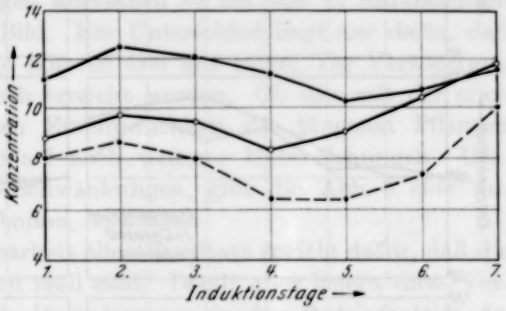


Abb. 4. Konzentrationsänderungen einzelner Aminosäuren im Verlaufe mehrtägiger photoperiodischer Induktion. (Konzentrationsangaben in „g Aminosäure-N/100 g Protein-N"). ●——● Leucin, ○——○ „Transleucine", ●– – –● Valin.

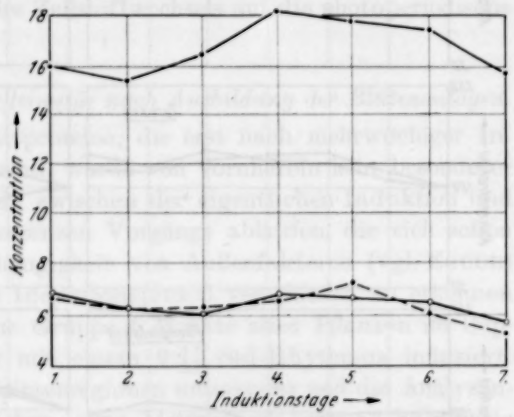


Abb. 5. Konzentrationsänderungen einzelner Aminosäuren im Verlaufe mehrtägiger photoperiodischer Induktion (Konzentrationsangaben in „g Aminosäure-N/100 g Protein-N"). ●——● Lysin, ○——○ α-Alanin, ●– – –● Glutaminsäure.

Trotz der durch die Kurvenglättung bereits bewirkten Mittelwertbildung könnten diese Ergebnisse ein Kunstprodukt darstellen, zumal die Abweichungen vom Kontrollwert wie auch die vom Konzentrationsdurchschnitt aller Versuchstage bei Zugrundelegen des t-Testes statistisch nicht signifikant sind. Daher wurde der Versuch Mitte Juni noch einmal wiederholt, diesmal mit 6 Monate alten Pflanzen einer späteren Aussaat, die aus dem nunmehr etwa 17stündigen natürlichen Langtag in das Kurztagzelt (9:15-Std Tag) gelangten. Obgleich das

[1] Wenn hier und im folgenden von „Glutaminsäure", „Valin" u. dgl. gesprochen wird, so sind damit die betreffenden „Gruppen" (Glutaminsäure-Threonin, Valin-Methionin u. dgl.) gemeint (s. o.).

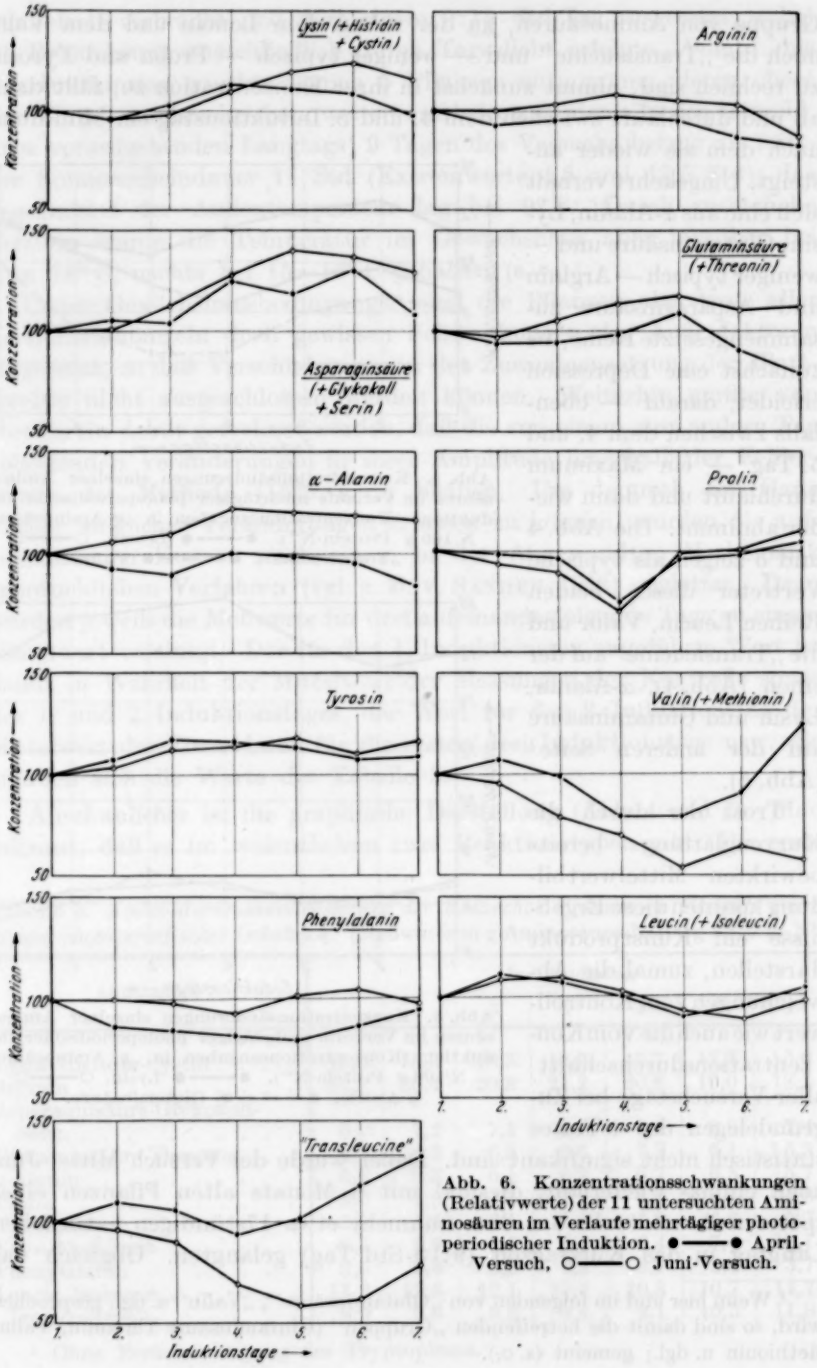


Abb. 6. Konzentrationsschwankungen (Relativwerte) der 11 untersuchten Aminosäuren im Verlaufe mehrtägiger photoperiodischer Induktion. ●——● April-Versuch, ○——○ Juni-Versuch.

Wetter zu dieser Zeit ziemlich trübe war (mittlere Tagestemperatur um 15° C), stieg mittags die Temperatur im Gewächshaus auf 20—22° C an. Vergleicht man nun die in dieser Versuchsreihe erhaltenen Werte mit denen des vorhergehenden Versuchs, so ergibt sich — von einzelnen unwesentlichen Abweichungen abgesehen — für alle 11 untersuchten Komponenten das gleiche Bild. Ein Unterschied liegt nur darin, daß die Wendepunkte für einige Kurven erst mit einem Tag Verzögerung gegenüber dem April-Versuch erreicht werden. Ob dies mit der noch geringeren photoperiodischen Empfindlichkeit der jüngeren Pflanzen zusammenhängen kann, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Umgerechnet auf prozentuale Schwankungen, gibt die Abb. 6 eine Zusammenstellung aller Ergebnisse.

Diese gute Reproduzierbarkeit aller Resultate spricht dafür, daß die beobachteten Veränderungen reell sind. Damit aber liefern diese Versuche das *Ergebnis, daß die Veränderungen in der Proteinfraktion der jüngsten Laubblätter unmittelbar nach Induktionsbeginn eintreten.* Sie können damit keine späten Sekundärreaktionen sein. Vielmehr darf wohl angenommen werden, daß sie in engem Zusammenhang stehen mit den primären Reaktionen des Zellstoffwechsels auf die photoperiodische Induktion.

c) Zusammensetzung der Zelleiweiße nach Ausbildung der Blütenanlagen.

Veränderungen der Blattproteine, die erst nach mehrwöchiger Induktionsdauer zu erfassen sind, wurde von vornherein kein besonderer Wert beigemessen (s. o.), da zwischen der eigentlichen Induktion und der Ausbildung der Infloreszenzen Vorgänge ablaufen, die sich schon durch ihre veränderte Abhängigkeit von Außenfaktoren (vgl. Eguchi 1937) als vom eigentlichen Induktionsprozeß verschieden zu erkennen geben. Dennoch wurde eine Gruppe 6 Monate alter Pflanzen im September 30 Tage hindurch mit einem 9:15 Std-Rhythmus induziert. Anschließend wurden die Spitzenregionen untersucht und die Analysenwerte denen für im natürlichen, etwa 14stündigen Langtag kultivierte Kontrollen gegenübergestellt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt die Tabelle 4.

Trotz Vergleichs von jeweils 3 Chromatogrammen ist auch hier keine der beobachteten Abweichungen statistisch signifikant. Bezieht man die 30-Tage-Werte statt auf die eigentlichen Kontrollen auf die im Frühjahr ermittelten (aus drei getrennten Ansätzen gewonnenen) Analysenwerte für vegetative *Kalanchoë*-Exemplare (Tabelle 1), so ergeben sich — vom Lysin abgesehen — für alle Aminosäuren gleichsinnige Abweichungen (eingeklammerte Werte der Tabelle 4), so daß auch die in der Tabelle 4 aufgeführten Daten wohl als reell betrachtet werden dürften.

Tabelle 4. *Aminosäurezusammensetzung vegetativer und 30 Tage hindurch photoperiodisch induzierter Kalanchoë-Exemplare (Sproßspitzen).* (Meßwerte in g Aminosäure-N/100 g Protein-N[1]).

Aminosäure	Vegetative Pflanze	Induzierte Pflanze	Prozentuale Änderung
Lysin-Histidin-Cystin	15,2	15,3	+ 0,7% (− 3,8%)[2]
Arginin	23,0	21,7	− 5,7% (−14,9%)
Asparaginsäure-Glykokoll-Serin	6,6	6,0	− 9,1% (− 4,8%)
Glutaminsäure-Threonin . .	7,0	5,9	−15,7% (0%)
α-Alanin	5,5	5,2	− 5,5% (−11,9%)
Prolin	4,1	4,6	+12,2% (+11,5%)
Tyrosin	5,0	7,6	+52,0% (+35,7%)
Valin-Methionin	8,9	7,4	−16,9% (− 5,1%)
Phenylalanin	3,2	5,1	+59,4% (+11,9%)
Leucin-Isoleucin	10,2	14,4	+41,2% (+38,5%)
„Transleucine“.	11,3	6,8	−39,8% (−19,0%)

[1] Ohne Berücksichtigung des Tryptophans.
[2] Bedeutung der eingeklammerten Werte siehe im Text.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Kurven der Abb. 6 läßt erkennen, daß sich der Konzentrationsanstieg für Leucin, Prolin und Tyrosin, unklarer jedoch für das Phenylalanin, bereits zu Ende der achttägigen Induktionsperiode abzeichnet. Ebenso läßt sich nach einer Woche bereits der Konzentrationsabfall für die basischen Aminosäuren sowie für α-Alanin, Glutamin- und Asparaginsäure, nicht jedoch für das Valin, erkennen. Die deutlichste Differenz aber liegt im Verhalten der „Transleucine“, die sich während des eigentlichen Induktionsprozesses wie die Leucine verhalten, nach 30 Tagen aber ein gegensinniges Verhalten erkennen lassen.

Diese Befunde beweisen, daß auch die zwischen dem 8. und 30. Induktionstag ablaufenden Differenzierungsprozesse die Eiweißzusammensetzung der jüngsten Blattetagen beeinflussen, daß aber andererseits *die während dieser Periode erfolgenden Proteinveränderungen keine bloße Fortsetzung der durch die eigentliche Induktion eingeleiteten Prozesse* sein können.

Diskussion.

Wie die vorliegenden Untersuchungen beweisen, sind *schon in den ersten Induktionstagen charakteristische Änderungen der Blatteiweiße* zu erfassen. Zwar lassen sich auch nach mehrwöchiger Induktion noch Differenzen erkennen, doch dürfen diese wohl nicht mit dem eigentlichen Induktionsprozeß in Verbindung gebracht werden. Vielmehr ist anzunehmen, daß sie mit späteren Differenzierungs- und Entwicklungsschritten (Differenzierung der einzelnen Blütenteile, Infloreszenzstreckung u. dgl.) zusammenhängen. Jedenfalls zeigt der Vergleich der

für kurzfristig und langdauernd induzierte *Kalanchoë*-Exemplare erhaltenen Analysendaten, daß zwischen dem 8. und 30. Induktionstag andere Prozesse ablaufen müssen als zwischen dem 1. und 8. Tag. Dieser Umstand erklärt den Mißerfolg nahezu aller chemischer Untersuchungen zum Problem des Photoperiodismus (vgl. bei SEN 1951), bei denen die entscheidenden Tage überhaupt nicht erfaßt wurden. Ausnahmen stellen die Experimente von GARNER, BACON und ALLARD (1924) sowie die von HIBBARD (1937) dar. Allein diese Untersuchungen erlauben eine Gegenüberstellung mit den für *Kalanchoë* erhaltenen — bis zur Bestätigung an anderen Objekten selbstverständlich zunächst auch nur für diese Pflanze gültigen — Ergebnissen (s. u.).

Die beträchtlichen tagesperiodischen p_H-Wert-Schwankungen des *Kalanchoë*-Preßsaftes (s. o.) dürften kaum ohne Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration des Protoplasmas bleiben. So war es von vornherein wahrscheinlich, daß es im Laufe des Tages und weiterhin im Gefolge der mit dem Induktionsprozeß verbundenen p_H-Verschiebungen (noch unveröffentlicht, vgl. auch GARNER, BACON und ALLARD 1924) zu Änderungen der Ladung und damit vermutlich weiterer *physikochemischer* Eigenschaften der Plasmaproteine kommt.

Daß neben solchen rein physikochemischen Erscheinungen auch Veränderungen im Chemismus der Eiweiße bzw. eine *Verschiebung im Konzentrationsverhältnis der einzelnen Proteinkomponenten* eintreten könnte, war von vornherein kaum zu erwarten. Vielmehr hat die Aminosäurezusammensetzung der Zelleiweiße lange Zeit hindurch als eine mehr oder weniger unveränderliche Größe gegolten (vgl. z. B. RABIDEAU und EDWARDS 1951), die man sogar zu phylogenetischen Betrachtungen glaubte heranziehen zu dürfen (MAZUR und CLARKE 1938, 1942). Gestützt wurde diese Ansicht noch durch das Mißlingen mehrerer Versuche, die Proteinzusammensetzung von Bakterienzellen durch Variation des Kulturmediums zu beeinflussen (CAMIEN, SALLE und DUNN 1945, FREELAND und GALE 1947).

Nur recht vereinzelt finden sich *Hinweise auf rein chemische Veränderungen der Zellproteine:* Mehrfach konnte eine gewisse Altersabhängigkeit nachgewiesen werden (LUGG und WELLER 1941, FOWDEN 1952b, SISAKJAN, BEZINGER und GUMILEVSKAJA 1953)[1]. Auch die Ernährungsbedingungen scheinen nicht ganz ohne Einfluß auf die Eiweißzusammensetzung der Zellen zu sein (STEWARD und THOMPSON 1954). Weiter fanden MCCOY, SUBLETT und DOBBS (1953) an *Avena*, daß auch die Tageslänge nicht zu vernachlässigen ist. Leider aber wurden in dieser Arbeit die freien und die im Eiweiß gebundenen Aminosäuren nicht getrennt

[1] Auch die mehrfach beschriebene Verschiebung des isoelektrischen Punktes pflanzlicher Zellen im Verlaufe der Alterung (vgl. SCHWANTES 1952) deutet auf Veränderungen der Proteinfraktion hin.

bestimmt, so daß nicht zu beurteilen ist, inwieweit sich die beobachteten Differenzen wirklich auf die Eiweißfraktion beziehen. Zum anderen werden auch in dieser Veröffentlichung nur Analysen vom 2. und 9. Induktionstag (und späteren Terminen) angeführt, so daß ein Vergleich mit den für *Kalanchoë* gemessenen Daten unmöglich ist.

Zieht man diejenigen Untersuchungen zum Vergleich heran, in denen auch die ersten Induktionstage erfaßt wurden, so findet man bei GARNER, BACON und ALLARD (1924) die Feststellung, daß es beim Übertragen photoperiodisch empfindlicher Pflanzen in induktive Bedingungen zu

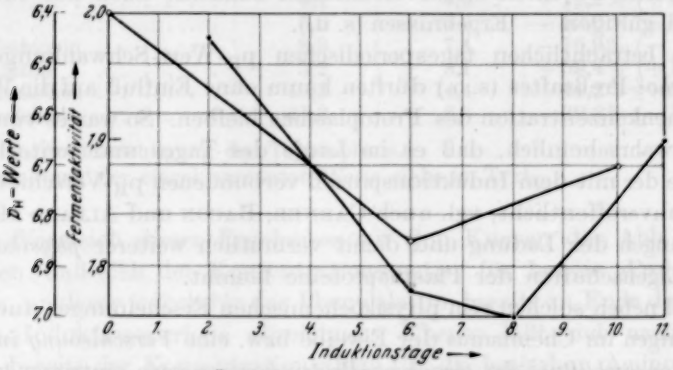


Abb. 7. Vergleich der p_H-Wert-Änderungen des Soja-Preßsaftes (nach GARNER, BACON und ALLARD 1924) mit den Schwankungen der Katalase-Aktivität des gleichen Objekts (nach HIBBARD 1937) im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion. ●——● p_H-Wert, ○——○ Fermentaktivität (Katalase).

einer vorübergehenden Veränderung des p_H-Wertes (des Preßsaftes) kommt, die nach einigen Tagen einen Wendepunkt erreicht und wenig später unter Umständen schon nicht mehr zu erfassen ist. HIBBARD (1937) hat dann später die Änderungen der enzymatischen Wirksamkeit pflanzlicher Extrakte im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion untersucht und für mehrere Fermente, u. a. für Katalase und Saccharase, charakteristische Änderungen im Laufe der ersten Induktionstage erhalten. Stellt man die von GARNER, BACON und ALLARD (1924) erhaltenen Veränderungen denen von HIBBARD (1937) gegenüber, so kommt man für beide Erscheinungen zu einem recht ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 7)[1]. Dieses Ergebnis legt zunächst eine rein physikochemische Erklärung nahe: Bekanntlich hängt die Aktivität aller Fer-

[1] *Nachtrag während der Korrektur:* Die nach Abschluß der vorliegenden Arbeit publizierten Untersuchungen von A. R. COOKE [Plant Physiol. **29**, 440 (1954)] über die Änderungen des Auxingehalts im Verlaufe einer photoperiodischen Induktion von Kurztagpflanzen konnten nicht mehr berücksichtigt werden. Die von COOKE beobachteten Schwankungen der Wuchsstoffmenge laufen im übrigen den Mengenänderungen der im Eiweiß gebundenen Aminosäuren (Leucin-Typ, s. o.) weitgehend parallel.

mente von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums ab. So könnten also die HIBBARDschen Resultate vielleicht nur die Schwankungen des intrazellulären p_H-Wertes widerspiegeln.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen nun aber, daß es zu *chemischen* Veränderungen der Zelleiweißfraktion kommt[1]. Vergleicht man die für die einzelnen Eiweißbausteine erhaltenen Konzentrationsänderungen — z. B. die für das Valin gemessenen Daten — mit den HIBBARDschen Werten, so ergibt sich das Bild der Abb. 8. Es ließen sich demnach die HIBBARDschen Resultate auch als Veränderungen der Ferment*menge* deuten. Dieser Schluß ist aus der Messung der fermenta-

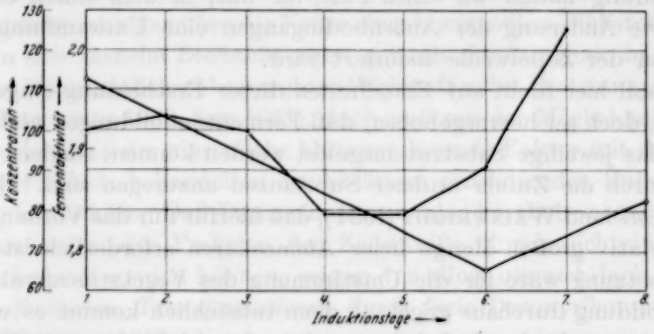


Abb. 8. Vergleich der von HIBBARD (1937) gemessenen Schwankungen der Katalase-Aktivität (für Soja) mit den Veränderungen der Valin-Konzentration in den *Kalanchoë*-Blatteiweißen im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion.
●——● Valin-Konzentration (Relativwerte), ○——○ Katalase-Aktivität (Relativwerte).

tiven Wirksamkeit von Zellextrakten höherer Pflanzen meines Wissens noch nie gezogen worden. Biochemische Untersuchungen der Blatteiweiße haben aber ergeben, daß zumindest dem überwiegenden Teil der Zellproteine fermentative Wirksamkeit zukommt (vgl. z. B. WILDMAN und BONNER 1947). Es ist demnach höchst unwahrscheinlich, daß sich die bei der *Kalanchoë* erfaßten Mengenveränderungen der Eiweiße nur auf einen — vielleicht noch vorhandenen — Rest enzymatisch inaktiver Proteine beschränken. *Vielmehr muß es als wahrscheinlich betrachtet werden, daß es bei der photoperiodischen Induktion zu einer Veränderung des Fermentbestandes zumindest der meristematischen Gewebe kommt.*

[1] Es mag zunächst als Nachteil einer rein chemischen Untersuchung der Eiweißfraktion empfunden werden, daß man keine Aufschlüsse darüber erhält, ob die Induktion nur zu einer Verschiebung im Mengenverhältnis der einzelnen Zellproteine führt oder ob einzelne Komponenten (bzw. eine einzige Komponente) neu gebildet werden. Es bleibt aber zu bedenken, daß „neu auftretende" Eiweißkörper möglicherweise auch in einer so geringen Menge vorgebildet sein könnten, daß sie sich auch einer physikochemischen Analyse (Elektrophorese, Trennung in der Ultrazentrifuge) entziehen würden. Diese Bedenken sprechen natürlich in keiner Weise gegen Versuche, die Untersuchung der im Eiweiß gebundenen Aminosäuren durch eine Analyse der intakten Zellproteine zu ergänzen.

Bei den Mikroorganismen haben wir gute Gründe für die Annahme, daß derartige Veränderungen der Fermentmenge tatsächlich eintreten können (vgl. STANIER 1951). Es hat sich zeigen lassen, daß es in vielen Fällen das Substrat selbst ist, das die Zellen zur Produktion eines sonst gar nicht oder aber in analytisch nicht faßbarer Menge vorliegenden Enzyms anregt. Diese *Erscheinung der sog. „fermentativen Adaptation"* ist nicht auf Bakterien beschränkt; sie konnte auch für Pilze (CHRISTENSEN und DALY 1951) und tierische Einzeller (BEALE 1953 u. a.) nachgewiesen werden. Einer Untersuchung höherer Pflanzen standen bisher noch methodische Schwierigkeiten im Wege. In dieser adaptiven Fermentbildung haben wir einen Fall vor uns, in dem durch eine klar definierte Änderung der Außenbedingungen eine Umwandlung in der Fraktion der Zelleiweiße induziert wird.

Es soll hier nicht auf Einzelheiten dieser Erscheinung eingegangen werden, doch sei hervorgehoben, daß Fermentneubildungen nicht allein durch das jeweilige Substrat ausgelöst werden können, sondern daß sie auch durch die Zufuhr anderer Substanzen anzuregen sind. Bei *Bacterium coli* fand WAINWRIGHT (1951), daß hierfür nur das Vorhandensein einer relativ großen Menge freier Aminosäuren erforderlich ist. Diese Voraussetzung wäre für die Umstimmung des Vegetationspunktes zur Blütenbildung durchaus gegeben; denn tatsächlich kommt es während der photoperiodischen Induktion zu einer *Anreicherung von Aminosäuren in der meristematischen Spitzenregion* (METZNER 1954c, vgl. auch SIRCAR und DE 1948).

Die Annahme einer *Beteiligung adaptiver Prozesse an der photoperiodischen Induktion* würde manchen sonst schwer erklärbaren Befund verständlich machen; insbesondere wären die „fraktionierte Induktion" (s. o.) und das langsame Abklingen einer „Teilinduktion" ohne weiteres mit der Erscheinung der enzymatischen Adaptation und Deadaptation vergleichbar. Es bedarf aber weiterer, speziell auf dieses Problem ausgerichteter Arbeiten, ehe eine sinnvolle Diskussion der möglichen Folgerungen zu vertreten ist.

Selbstverständlich dürfen aber auch die in anderen Stoffklassen ablaufenden Veränderungen nicht unberücksichtigt bleiben. So lassen sich auch in der Fraktion der freien Aminosäuren Differenzen erfassen, die noch einer quantitativen Analyse bedürfen. Sicherlich kommt einzelnen Komponenten außer ihrer Bedeutung als Eiweißbaustein auch noch eine wichtige physiologische Funktion zu[1]. So steigern Histidin, Glykokoll und Tryptophan (bei *Elodea*) im Licht die O_2-Ausscheidung, im Dunkeln den Sauerstoffverbrauch (ZANONI 1950, vgl. auch MOTHES

[1] Es ist denkbar, daß auch der Fraktion der freien Aminosäuren in ihrer Gesamtheit eine besondere Bedeutung beizumessen ist. So soll sie eine Steigerung des Sukkulenzgrades bewirken (PEARSALL und EWING 1929).

1931). Histidin regt überdies bereits in hormonaler Konzentration die Plasmaströmung an (FITTING 1933), während das Tyrosin Zellteilungen auszulösen vermag (ORSÓS 1936). Als Ausgangsprodukt für die Synthese der β-Indolylessigsäure kommt dem Tryptophan eine ganz besondere Bedeutung für die Wachstumsprozesse zu.

Es ist durchaus denkbar, daß jeder Differenzierungsprozeß eine Veränderung der Zelleiweiße zur Voraussetzung hat. Im Falle der Determination von Blütenanlagen dürfen aber die beobachteten Proteinänderungen nicht als Hinweis darauf gewertet werden, daß ein in den induzierten Laubblättern möglicherweise entstehender Wirkstoff in der Eiweißfraktion zu suchen ist. Die vorliegenden Versuche sagen nichts aus über die Existenz oder gar über die Natur eines hormonalen Blühstoffs. Zwar würden sich manche Beobachtungen gut mit der Annahme in Einklang bringen lassen, daß der übertragbare Wirkstoff selbst Proteinnatur besitzt (vgl. STEINBERG 1950, SEN 1951), doch muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der eigentliche blütenauslösende Faktor mit der in den photoperiodisch behandelten Laubblättern entstehenden Substanz gar nicht identisch ist. Daß Determinationen, also letztlich vermutlich Umbauprozesse in der Fraktion der Zelleiweiße, durch nichteiweißartige Stoffe bedingt werden können, zeigen vor allem die mehrfach beschriebenen *Bakterien- Transformationen* durch freie Desoxyribonucleinsäure (vgl. BÜNNING 1953).

Sicherlich ist das komplexe Problem der Differenzierung nicht durch die Gegenüberstellung einiger biochemischer Analysendaten zu lösen. Die vorstehenden Resultate ermutigen aber dazu, das Phänomen der photoperiodischen Induktion auch weiterhin mit moderner biochemischer Methodik zu bearbeiten.

Zusammenfassung.

Zur Untersuchung der Zelleiweiße der Kurztag-*Crassulacee Kalanchoë Bloßfeldiana* wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, Blattproteine auch aus gerbstoffreichen Pflanzen zu isolieren.

Die Proteinfraktion der jüngsten Blätter wurde einer sauren Hydrolyse unterworfen; unter den Spaltprodukten konnten 24 ninhydrinpositive Substanzen aufgefunden werden; davon ließen sich 18 Komponenten mit bekannten Aminosäuren identifizieren.

Die aus der Spitzenregion der *Kalanchoë* isolierten Blattproteine unterscheiden sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung von den von anderen Autoren untersuchten Zelleiweißen aus den Dauergeweben höherer Pflanzen sowie von den bekannten Algenproteinen. Insbesondere ist der Anteil an basischen und cyclischen Aminosäuren gegenüber den Aminodicarbonsäuren deutlich erhöht. Diese Abweichungen sprechen für einen höheren Histongehalt — und damit vermutlich auch

höheren Nucleoproteidgehalt — der untersuchten meristematischen Gewebe.

Während der photoperiodischen Induktion kommt es in der Spitzenzone zu einer Veränderung der Zelleiweiße, die sich durch die quantitative Auftrennung der Hydrolyseprodukte erfassen läßt. Diese unmittelbar nach Induktionsbeginn eintretenden Verschiebungen im Mengenverhältnis der einzelnen Aminosäuren zeigen keine eindeutige Abhängigkeit von der Induktionsdauer; vielmehr durchlaufen die Konzentrationskurven innerhalb weniger Tage zwei mehr oder weniger deutliche Wendepunkte.

Die nach 30tägiger Induktion feststellbaren Eiweißveränderungen lassen sich nicht ohne weiteres auf die in den ersten Induktionstagen ablaufenden Prozesse zurückführen.

Die möglichen Zusammenhänge der beobachteten Eiweißumsetzungen mit Veränderungen im Enzymbestand der Zellen werden diskutiert.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in den Jahren 1951—1954 im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen durchgeführt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R. HARDER, möchte ich für seine wertvollen Anregungen und sein stetes Interesse auch an dieser Stelle aufrichtig danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die großzügige Bewilligung von Sachbeihilfen zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

ACHER, R., C. FROMAGEOT et M. JUTISZ: Séparations chromatographiques d'acides aminés et de peptides. V. Les acides aminés individuels de l'insuline avec une note sur le dosage de la proline. Biochem. et Biophysica Acta (Amsterd.) **5**, 81 (1950). — ACKERMANN, D., G. BLIX, K. FELIX, W. GRASSMANN, F. SCHNEIDER u. J. TRUPKE: Eiweißstoffe und ihre Abbaustufen. In B. FLASCHENTRÄGER u. E. LEHNARTZ, Physiologische Chemie, Bd. I. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951. — ÅKERFELD, S.: A spot area method for quantitative determination of amino acides on two dimensional paper chromatograms. Acta chem. scand. (Copenh.) **8**, 521 (1954). — ALLSOPP, A.: Chromatographical study of meristematic plant tissues. Nature (Lond.) **161**, 833 (1948). — BEALE, G. H.: Adaptations in Paramecium. 3. Symp. Soc. gen. Microbiol. London 1953, S. 294. — BECKER, T.: Wuchsstoff- und Säureschwankungen bei *Kalanchoë Bloßfeldiana* in verschiedenen Licht-Dunkelwechseln. Planta (Berl.) **43**, 1 (1953). — BLOCK, R. J.: Estimation of amino acids and amines on paper chromatograms. Analyt. Chem. **22**, 1327 (1950). — BLOUCH, R., M. G. PAYNE and J. L. FULTS: Free amino acids in sugar-beet leaves altered by zinc dimethyldithiocarbamate. Bot. Gaz. **114**, 248 (1952). — BODE, F., H. J. HÜBENER, H. BRÜCKNER u. K. HOERES: Eine einfache quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Papierchromatogramm. Naturwiss. **39**, 524 (1952). — BOISSONNAS, R. A.: Dosage colorimétrique des acides aminés séparés par chromatographie sur papier. Helvet. chim. Acta **33**, 1975 (1950). — BONNER, J.: Plant proteins. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **6**, 290 (1950). — BONNER, J., and D. BONNER: Note on induction of flowering in *Xanthium*. Bot. Gaz. **110**, 154 (1948). — BONNER, J., and J. THURLOW: Inhibition of photoperiodic induction in *Xanthium* by applied auxin. Bot. Gaz. **110**, 613 (1949). — BORTHWICK, H. A., M. W. PARKER and P. H. HEINZE: The influence of localized low temperature on

Biloxi soybeans during photoperiodic induction. Bot. Gaz. **102**, 792 (1941). — Brüggemann, J., u. K. Drepper: Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren auf Papierchromatogrammen. Naturwiss. **39**, 301 (1952). — Bünning, E.: Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 590 (1937). — Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953. — Bünsow, R.: Über tages- und jahresrhythmische Änderungen der photoperiodischen Lichtempfindlichkeit bei *Kalanchoë Bloßfeldiana* und ihre Beziehungen zur endogenen Tagesrhythmik. Z. Bot. **41**, 257 (1953). — * Čajlachjan, M. C.: On the hormonal theory of plant development. C. r. Acad. Sci. URSS., N. S. **3**, 443 (1936a). — * New facts in support of the hormonal theory of plant development. C. r. Acad. Sci. URSS., N. S. **4**, 79 (1936b). — Translocation of flowering hormones across various plant organs. III. Across the root. C. r. Acad. Sci. URSS., N. S. **27**, 373 (1940). — * Translocation of flowering hormones in the plant as affected by temperature and narcotics. C. r. Acad. Sci. URSS., N. S. **31**, 945 (1941). — Camien, M. N., A. J. Salle and M. S. Dunn: Investigations of amino acids, peptides and proteins. XXII. Percentages of some amino acids in lactobacilli. Arch. of Biochem. **8**, 67 (1945). — Chibnall, A. C.: Protein metabolism in the plant. New Haven 1939. — Chibnall, A. C., E. J. Miller, D. H. Hall and R. G. Westall: The proteins of grasses. II. A new method of preparation. Biochemic. J. **27**, 1879 (1933). — Chouard, P.: Une synthèse nouvelle des causes de la floraison et des théories du photopériodisme. C. r. Acad. Sci. Paris **216**, 591 (1943). — Christensen, J. J., and J. M. Daly: Adaptation in fungi. Ann. Rev. Microbiol. **5**, 57 (1951). — Christiansen, J.: Beiträge zum Mechanismus der Pepsinverdauung. Biochem. Z. **47**, 226 (1912). — Crook, E. M.: The extraction of nitrogenous materials from green leaves. Biochemic. J. **40**, 197 (1946). — Crumpler, H. R., and C. E. Dent: Distinctive test for α-amino-acids in paper chromatography. Nature (Lond.) **164**, 441 (1949). — Danielsson, K. E.: Precipitation of proteins with tannic acid. Svensk kem. Tidskr. **60**, 142 (1948). — Denffer, D. v.: Über die Wechselbeziehungen zwischen Stickstoffbedürfnis und photoperiodischer Reaktion bei einigen Lang- und Kurztagpflanzen. Planta (Berl.) **31**, 418 (1940). — Blühhormon oder Blühhemmung? Neue Gesichtspunkte zur Physiologie der Blütenbildung. Naturwiss. **37**, 296, 317 (1950). — Dent, C. E.: The amino-aciduria in Fanconi syndrome. A study making extensive use of techniques based on paper partition chromatography. Biochemic. J. **41**, 240 (1947). — Derrien, Y.: Studies on proteins by means of salting-out curves. I. Method of establishment of salting-out curves of proteins. Biochem. et Biophysica Acta (Amsterd.) **8**, 631 (1952). — * Eguchi, T.: Effects of the day-length upon the time of differentiation of flower bud and the subsequent development to flowering. Proc. Imp. Acad. Tokyo **13**, 332 (1937). — Ehrenberg, M.: Über die Bestimmung von Fermenten in Gegenwart von Gerbstoffen. (Bestimmung der Phosphatase-Aktivität in Blättern der *Crassulacee Kalanchoë Bloßfeldiana*.) Biochem. Z. **325**, 102 (1954). — Emmerich, H.: Der Einfluß zusätzlicher Wirkstoffbehandlung auf Wachstum und Entwicklung der Pflanzen. Jb. Bot. **90**, 99 (1942). — Fischer, F. G., u. H. Dörfel: Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweiß-Hydrolysaten. Biochem. Z. **324**, 544 (1953). — Fisher, R. B., D. S. Parsons and G. A. Morrison: Quantitative paper chromatography. Nature (Lond.) **161**, 764 (1948). — Fitting, H.: Untersuchungen über die Empfindlichkeit und das Unterscheidungsvermögen der *Vallisneria*-Protoplasten für verschiedene α-Aminosäuren. Jb. Bot. **77**, 1 (1933). — Fowden, L.: The composition of the bulk proteins of *Chlorella*. Biochemic. J. **50**, 355 (1952a). — The effect of age on the bulk protein composition of *Chlorella vulgaris*. Biochemic. J. **52**, 310 (1952b). — A comparison of the compositions of some algal proteins. Ann. of Bot., N. S. **18**, 257 (1954). — Freeland,

J. C., and E. F. GALE: The amino acid composition of certain bacteria and yeasts. Biochemic. J. **41**, 135 (1947). — FREUDENBERG, K.: Die natürlichen Gerbstoffe. In G. KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. III/2, S. 344. Wien 1932. — Tannin, Cellulose, Lignin. Berlin 1933. — GALSTON, A. W.: Transmission of the floral stimulus in soybean. Bot. Gaz. **110**, 495 (1949). — GANGULI, N. C.: Modified unidimensional paper chromatography. Naturwiss. **41**, 282 (1954). — GARNER, W. W., and H. A. ALLARD: Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. J. Agricult. Res. **18**, 553 (1920). — GARNER, W. W., C. W. BACON and H. A. ALLARD: Photoperiodism in relation to hydrogen-ion concentration of the cell sap and the carbohydrate content of the plant. J. Agricult. Res. **27**, 119 (1924). GERHARD, E.: Über die Entwicklung der Pflanzen unter dem Einfluß der Tageslänge und der Temperatur im Jugendstadium. J. Landwirtsch. **87**, 161 (1940). — GIRI, K. V., u. A. NAGABHUSHANAM: Sodium 1:2-naphthoquinone-4-sulfonate as a reagent for identification of amino acids and peptides and for quantitative estimation of proline and hydroxyproline separated on paper chromatograms. Naturwiss. **39**, 548 (1952). — GIRI, K. V., and N. A. N. RAO: A technique for the identification of amino-acids separated by circular paper chromatography. Nature (Lond.) **169**, 923 (1952). — GRANICK, S.: Quantitative isolation of chloroplasts from higher plants. Amer. J. Bot. **25**, 558 (1938). — HAMNER, K. C.: Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. Bot. Gaz. **101**, 658 (1940). — HAMNER, K. C., and J. BONNER: Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. Bot. Gaz. **100**, 388 (1938). — HANSON, E. A.: A note on the metabolism of chloroplast protein. Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **19**, 157 (1941). — HARDER, R.: Die Entwicklung der Forschung über das Blüh-Hormon der Pflanzen. Göttinger Gelehrte Anz. **202**, 49 (1940a). — Scheinblüten und Blühhormonmenge. Ber. dtsch. bot. Ges. **58**, 70 (1940b). — Über den Einfluß der Tageslänge nach der photoperiodischen Induktion auf die Infloreszenzen von *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Planta (Berl.) **42**, 19 (1953). — HARDER, R., u. O. BODE: Über Wechselbeziehungen zwischen Blütenbildung, Brakteenverlaubung und Sukkulenz der Laubblätter bei *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Flora (Jena) **36**, 85 (1942). — HARDER, R., u. I. STÖRMER: Weitere Untersuchungen über den Einfluß des Follikelhormons auf die Pflanzen. Jb. Bot. **81**, 383 (1935). — HARDER, R., u. H. v. WITSCH: Wirkung von Photoperiodismus und Yarowisation auf die Blütenbildung von *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Gartenbauwiss. **15**, 226 (1940). — HAUROWITZ, F.: Chemistry and biology of proteins. New York 1950. — HAUSCHILD, I.: Über die an der photoperiodischen Reaktion der Kurztagspflanzen beteiligten Vorgänge. Diss. Math.-naturwiss. Fakultät Göttingen 1943. — HEYNS, K., u. W. WALTER: Über Proteine und deren Abbauprodukte. V. Papierchromatographische Trennung der isomeren Leucine. Z. physiol. Chem. **287**, 15 (1951). — HIBBARD, A. D.: Photoperiodism and enzyme activity in the soybean plant. Univ. Missouri, Agricult. Exper. Stat. Res. Bull. **1937**, 271. — HILLER, E., F. ZINNERT u. G. FRESE: Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren in Papierchromatogrammen. Biochem. Z. **323**, 245 (1952). — KAWERAU, E., and T. WIELAND: Conservation of amino-acid chromatograms. Nature (Lond.) **168**, 77 (1951). — KLEBS, G.: Über Probleme der Entwickelung. III. Biol. Zbl. **24**, 449, 481, 545, 601 (1904). — Über Variationen der Blüten. Jb. Bot. **42**, 155 (1906). — KNODEL, H.: Läßt sich die KLEBSsche Ansicht über die Abhängigkeit der Blütenbildung von der chemischen Zusammensetzung der Pflanze aufrechterhalten? Z. Bot. **29**, 449 (1936). — KNOTT, J. E.: Effect of a localized photoperiod on spinach. Proc. Amer. Soc. Horticult. Sci. **31**, Suppl., 152 (1934). — KNÜCHEL, F.: Fraktionierte Fällung

der Serumeiweißkörper mit Methanol. Z. exper. Med. **116**, 575 (1951). — KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, 2. Aufl. Dresden u. Leipzig 1943. — KUIJPER, J., and L. K. WIERSUM: Occurrence and transport of a substance causing flowering in the soybean (*Glycine hispida* Max.). Proc. roy. Acad. Amsterd. **39**, 1114 (1936). — LANDUA, A. J., and J. AWAPARA: Use of modified ninhydrin reagent in quantitative determination of amino acids by paper chromatography. Science (Lancaster, Pa.) **109**, 385 (1949). — LANG, A.: Physiology of flowering. Annual Rev. Plant Physiol. **3**, 265 (1952). — LANG, A., u. G. MELCHERS: Die photoperiodische Reaktion von *Hyoscyamus niger*. Planta (Berl.) **33**, 653 (1943). — Auslösung von Blütenbildung bei Langtagpflanzen unter Kurztagbedingungen durch Aufpfropfung von Kurztagpflanzen. Z. Naturforsch. **3b**, 108 (1948) — LEHNARTZ, E.: Einführung in die Chemische Physiologie, 7. Aufl. Berlin u. Heidelberg 1947. — LOEW, O.: Zur Theorie der blütenbildenden Stoffe. Flora (Jena) **94**, 124 (1905). — LONA, F.: Sui fenomeni di induzione, post-effetto e localizzazione fotoperiodica. L'induzione antogena indiretta delle foglie primordiali di *Xanthium italicum* Moretti. Nuovo Giorn. bot. ital., N. S. **53**, 548 (1946). — LONG, E. M.: Photoperiodic induction as influenced by environmental factors. Bot. Gaz. **101**, 168 (1939). — LUGG, J. W. H.: The representativeness of extracted samples and the efficiency of extraction of protein from the fresh leaves of plants; and some partial analyses of the whole proteins of leaves. Biochemic. J. **33**, 110 (1939). — Plant proteins. Adv. Protein Chem. **5**, 229 (1949). — LUGG, J. W. H., and R. A. WELLER: Protein metabolism in seed germination. Biochemic. J. **35**, 1099 (1941). — Protein in senescent leaves of *Trifolium subterraneum:* partial amino-acid composition. Biochemic. J. **42**, 412 (1948). — MARTIN, A. J. P., and R. L. M. SYNGE: Analytical chemistry of the proteins. Adv. Protein Chem. **2**, 1 (1945). — MATTHIAS, W.: Serienuntersuchungen mit Hilfe einer neuen Form der Streifen-Papierchromatographie. Naturwiss. **41**, 17 (1954). — MAZUR, A., and H. T. CLARKE: The amino acids of certain marine algae. J. of Biol. Chem. **123**, 729 (1938). — Chemical components of autotrophic organisms. J. of Biol. Chem. **143**, 39 (1942). — MCCOY, T. A., T. H. SUBLETT and V. W. DOBBS: The relation of the amino acid composition to the development of oats. Plant Physiol. **28**, 77 (1953). — MELCHERS, G.: Die Wirkung von Genen, tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von *Hyoscyamus niger* L. Biol. Zbl. **57**, 568 (1937). — MELCHERS, G., u. A. LANG: Weitere Untersuchungen zur Frage der Blühhormone. Biol. Zbl. **61**, 16 (1941). — METZNER, H.: Ultrafiltration in der Zentrifuge. Naturwiss. **40**, 388 (1953). — Unterschiede in der Eiweißfraktion bei Lang- und Kurztagsexemplaren von *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. IIb, **1954a**, 19. — Enzymologie der Plastiden. Z. Bot. **42**, 473 (1954b). — Beziehungen zwischen Eiweißstoffwechsel und Blütenbildung. Kongreßber. Internat. Photobiol. Kongr. Amsterd. 1954c (im Druck). — MORTON, R. K.: Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. Nature (Lond.) **166**, 1092 (1950). — MORTREUIL, M., et Y. KHOUVINE: Dosage des acides aminés par les complexes colorés dicéto-hydrindylidène-hydrindamine-sels de cadmium. Bull. Soc. Chim. biol. Paris **36**, 425 (1954). — MOSHKOV, B. S.: Transfer of photoperiodic reaction from leaves to growing points. C. r. Acad. Sci. URSS., N. S. **24**, 489 (1939). — MOTHES, K.: Zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen. 3. Beitrag. (Unter besonderer Berücksichtigung des Blattalters und des Wasserhaushaltes.) Planta (Berl.) **12**, 686 (1931). — NAYLOR, A. W.: Effects of some environmental factors on photoperiodic induction of beet and dill. Bot. Gaz. **102**, 557 (1941). — NEURATH, H., J. P. GREENSTEIN, F. W. PUTNAM and J. O. ERICKSON: The chemistry of protein denaturation. Chem. Rev. **34**, 157

(1944). — ORSÓS, O.: Untersuchungen über die sogenannten Nekrohormone. Protoplasma (Wien) **26**, 351 (1936). — OVERBEEK, J. VAN: Control of flower formation and fruit size in the pineapple. Bot. Gaz. **108**, 64 (1946). — PARKER, M. W., and H. A. BORTHWICK: Effect of photoperiod on development and metabolism of the Biloxi soy bean. Bot. Gaz. **100**, 651 (1939). — PARTRIDGE, S. M.: Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. Biochemic. J. **42**, 238 (1948). — PATTON, A. R., and P. CHISM: Quantitative paper chromatography of amino acids. An evaluation of techniques. Analyt. Chem. **23**, 1683 (1951). — PEARSALL, W. H.: Stickstoff-Stoffwechsel der Pflanzen. Endeavour **8**, 99 (1949). — PEARSALL, W. H., and J. EWING: The relation of nitrogen metabolism to plant succulence. Ann. of Bot. **43**, 27 (1929). — PFEIFFER, P.: Organische Molekülverbindungen, 2. Aufl. Stuttgart 1927. — PFENNIG, N.: Günstige Lösungsmittelkombination für zweidimensionale Papierchromatographie von Aminosäuren. Naturwiss. **41**, 62 (1954). — PUTNAM, F. W.: Protein denaturation. In H. NEURATH and K. BAILEY, The proteins: chemistry, biological activity, and methods, Bd. I/b, S. 807. New York 1953. — RABIDEAU, G. S., and M. B. EDWARDS: Nitrogen and amino acid content of the various parts of *Andropogon ischaemum* L. Plant Physiol. **26**, 798 (1951). — RASUMOV, V. I.: Über die photoperiodische Nachwirkung im Zusammenhang mit der Wirkung verschiedener Aussaattermine auf die Pflanzen. Planta (Berl.) **10**, 345 (1930). — REDFIELD, R. R., and E. S. G. BARRON: Quantitative determination of amino acids in protein hydrolyzates by paper chromatography. Arch. of Biochem. a. Biophysics **35**, 443 (1952). — REES, M. W.: Estimation of threonine and serine in proteins. Biochemic. J. **40**, 632 (1946). — ROBERTS, R. H.: The induction of flowering with a plant extract. In F. SKOOG, Plant growth substances, S. 347. Univ. of Wisconsin 1951. — ROCKLAND, L. B., J. L. BLATT and M. S. DUNN: Smale scale filter paper chromatography. Analyt. Chem. **23**, 1142 (1951). — ROCKLAND, L. B., and M. S. DUNN: Quantitative determination of amino acids on filter paper chromatograms by direct photometry. J. Amer. Chem. Soc. **71**, 4121 (1949). — RÖMPP, H.: Chemie-Lexikon. Stuttgart 1947. — RUTTER, L.: A modified technique in filter-paper chromatography. Nature (Lond.) **161**, 435 (1948). — SACHS, J.: Über den Einfluß des Tageslichts auf Neubildung und Entfaltung verschiedener Pflanzenorgane. Bot. Ztg **21**, Beilage (1863). — SAIFER, A., and J. ORESKES: Circular paper chromatography. Studies of physical factors that may influence R_F values. Analyt. Chem. **25**, 1539 (1953). — SANDEN, H. v.: Praktische Mathematik. Leipzig 1948. — SBARSKI, I. B., u. S. S. DEBOW: Die Eiweißfraktionen der Zellkerne. Sowjetwiss., Naturwiss. Abt. **5**, 29 (1952). — SCHOELLER, W., u. H. GOEBEL: Die Wirkung des Follikelhormons auf Pflanzen. Biochem. Z. **240**, 1 (1931). — SCHWANTES, H. O.: Färbungsanalytische Untersuchungen zur Lage des isoelektrischen Punktes der Zellbestandteile in wachsenden Zellen und Geweben. I. Untersuchungen an Pilzmyzelien. Protoplasma (Wien) **41**, 382 (1952). — SEN, S. P.: The biochemical aspects of flowering. Bull. Bot. Soc. of Bengal **5**, 87 (1951). — SENDEN, H. VAN: Untersuchungen über den Einfluß von Heteroauxin und anderen Faktoren auf die Blütenbildung bei der Kurztagspflanze *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Biol. Zbl. **70**, 537 (1951). — SIDERIS, C. P., H. Y. YOUNG and H. H. Q. CHUN: Diurnal changes and growth rates as associated with ascorbic acid, titratable acidity, carbohydrate and nitrogenous fractions in the leaves of *Ananas comosus* (L.) Merr. Plant Physiol. **23**, 38 (1948). — SIFFERD, R. H.: Preparation of amino acids. United States Patent Office 2460040, 1949. — SIRCAR, S. M., and B. N. DE: Studies in the physiology of rice. IV. The effect of photoperiodic induction on

nitrogen metabolism of winter paddy. Proc. Nat. Inst. Sci. India **14**, 263 (1948). — SIRONVAL, C.: Relation entre la nature de l'insaponifiable des limbes et la floraison chez *Fragaria Vesca* L. var. *semperflorens* Duch. Bull. Sci. Acad. roy. Belg. **36**, 779 (1950). — * SISAKJAN, N. M., E. N. BEZINGER i E. B. KUVAEVA: Die Aminosäurezusammensetzung der Eiweißstoffe der Plastiden. Biochimija **16**, 358 (1951). — * SISAKJAN, N. M., E. N. BEZINGER i N. A. GUMILEVSKAJA: Über die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung des Eiweißes der Plastiden im Laufe der Lebensfunktion des Organismus. Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. S. **91**, 907 (1953). — SMITH, E. L.: The chlorophyll-protein compound of the green leaf. The action of sodium dodecyl sulfate on the chlorophyll-protein compound. J. Gen. Physiol. **24**, 565 (1941). — SNYDER, W. E.: Mechanism of the photoperiodic response of *Plantago lanceolata* L., a long-day plant. Amer. J. Bot. **35**, 520 (1948). — STANIER, R. Y.: Enzymatic adaptation in bacteria. Annual Rev. Microbiol. **5**, 35 (1951). — STEINBERG, R. A.: Flowering responses of a variety of *Nicotiana rustica* to organic compounds in aseptic culture. Amer. J. Bot. **37**, 547 (1950). — STEWARD, F. C., and J. F. THOMPSON: The nitrogenous constituents of plants with special reference to chromatographic methods. Annual Rev. Plant Physiol. **1**, 233 (1950). — Proteins and protein metabolism in plants. In H. NEURATH and K. BAILEY, The proteins: chemistry, biological activity, and methods, Bd.II/a, S. 513. New York 1954. — STOLL, A., E. WIEDEMANN u. A. RÜEGGER: Zur Kenntnis des Chloroplastins. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **1941**, 125. — THOMPSON, J. F., R. M. ZACHARIAS and F. C. STEWARD: Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper: a quantitative procedure. Plant Physiol. **26**, 375 (1951). — TINCKER, M. A. H.: The effect of length of day upon the growth and chemical composition of the tissues of certain economic plants. Ann. of Bot. **42**, 101 (1928). — TURBA, F.: Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954. — ULLRICH, H.: Photoperiodismus und Blühhormone. Ber. dtsch. bot. Ges. **57**, (40) (1939). — UNDERWOOD, G. E., and F. E. DEATHERAGE: A study of the amino acids of green and roasted coffee including a new method of protein hydrolysis. Food Res. **17**, 425 (1952). — WAARD, J. DE, and J. W. M. ROODENBURG: Premature flower-bud initiation in Tomato-seedlings caused by 2,3,5-triiodobenzoic acid. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. **51**, 248 (1948). — WAINWRIGHT, S. D.: Formation of a bacterial adaptive enzyme system in the absence of substrate: production of nitratase by *Bacterium coli* without nitrate. Brit. J. Exper. Path. **31**, 495 (1951). — WAYGOOD, E. R., and K. A. CLENDENNING: Intracellular localization and distribution of carbonic anhydrase in plants. Science (Lancaster, Pa.) **113**, 177 (1950). — WIELAND, T., u. L. WIRTH: Papierchromatographische Analyse der durch Erhitzen mit Alkali gebildeten Zersetzungsprodukte von Serin, Threonin und Cystein. Chem. Ber. **82**, 468 (1949). — WIGGINS, L. F., and J. H. WILLIAMS: Use of n-butanol-formic acid-water mixture in the paper chromatography of amino-acids and sugars. Nature (Lond.) **170**, 279 (1952). — WILDMAN, S. G., and J. BONNER: The proteins of green leaves. I. Isolation, enzymatic properties and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. Arch. of Biochem. **14**, 381 (1947). — WILDMAN, S. G., and A. T. JAGENDORF: Leaf proteins. Annual Rev. Plant Physiol. **3**, 131 (1952). — WINTERSTEIN, E. H., u. A. WINTERSTEIN: Phosphatide. In G. KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. II/1, S. 677. Wien 1932. — WISSELINGH, C. VAN: Over het aantoonen van looistof in de levende plant en over hare physiologische beteekenis. Versl. van de gew. verg. d. wis- en natuurkund. Afdeeling, Kon. Akad. Wetensch. Amsterd. **18**, 680 (1910). — WITHROW, A. P., and R. B. WITHROW: Translocation of the floral

stimulus in *Xanthium*. Bot. Gaz. **104**, 409 (1943). — WITTING, A.: Repetitorium und Aufgabensammlung zur Differentialrechnung. Berlin 1944. — YEMM, E. W., and B. F. FOLKES: The amino acids of cytoplasmic and chloroplastic proteins of barley. Biochemic. J. **55**, 700 (1953). — ZANONI, G.: Azione degli aminoacidi sul ricambio respiratorio e fotosintetico delle piante. Nota I. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **26**, 1297 (1950). — ZIESE, W.: Fermentative Methodik. In G. KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. IV/2, S. 907. Wien 1933. — ZIMMERMANN, P. W., and A. E. HITCHCOCK: Flowering habit and correlation of organs modified by triiodobenzoic acid. Contrib. Boyce Thompson Inst. **12**, 491 (1942). — Triiodobenzoic acid influences flower formation in tomatoes. Contrib. Boyce Thompson Inst. **15**, 353 (1949). — ZOLLIKOFER, C.: Zur Wirkung des Oestrons auf pflanzliche Entwicklungsvorgänge. Biol. Zbl. **67**, 101 (1948).

Von den durch * gekennzeichneten Arbeiten standen mir lediglich Referate zur Verfügung.

Dr. HELMUT METZNER,
Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen.

Planta, Bd. 45, S. 535—548 (1955).

Aus dem Physiologischen und Genetischen Laboratorium des Forschungsinstituts für Landwirtschaft der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Martonvásár, Ungarn.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE XEROMORPHISCHEN GRADIENTEN EINIGER KULTURPFLANZEN.

Von

G. L. Farkas und T. Rajháthy.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Januar 1955.)

A. Einleitung.

In ihren quantitativen anatomischen Eigenschaften können die oberen Blätter der Pflanzen charakteristische, von denen der unteren Blätter abweichende Werte aufweisen, da ihre Epidermis- und Stomazellen kleiner sind, ihre auf die Flächeneinheit bezogene Stomazahl größer und die Entwicklung ihrer Palisaden- und Leitgewebe mehr ausgeprägt ist. Die xerophytischen Pflanzen zeigen im allgemeinen einen ähnlichen Charakter. Eben deshalb wurden die erwähnten Eigenschaften von Zalensky (1904, 1923) als xeromorphische aufgefaßt und als deren Erklärung die Hypothese einer ungenügenden Wasserversorgung der oberen Blätter entwickelt.

Dieser Fragenkomplex wurde auf experimentellem Wege noch wenig untersucht. Im selben Sinne äußerte sich kürzlich auch Stocker (1954), indem er ausdrücklich betonte, daß die früheren Auffassungen über die xeromorphischen Merkmale kritisch revidiert werden müssen. Es schien also wünschenswert, uns mit den Problemen der xeromorphischen Gestaltung von der obenerwähnten Fragestellung ausgehend zu befassen.

Eine neuere, diesbezügliche Angabe bietet wohl die Feststellung, daß dieser nach oben gerichtete Gradient der Xeromorphie bei einigen tropischen Epiphyten, entsprechend ihrem eigentümlichen Wasserhaushalt, nicht zu beobachten ist (Rasdorsky 1950). Auch die Untersuchungen von Felföldy in Ungarn weisen darauf hin, daß bei einigen hydrophilen Pflanzen der Gradient sich nicht gut entwickelt (persönliche Mitteilung 1954). Die reichliche Wasserversorgung dieser Pflanzen macht diese Feststellung im Sinne der Zalenskyschen Auffassung verständlich. Es sei auch auf einige ältere, aber wohl nur in der russischen Literatur bekanntgewordene Beobachtungen von Alexandrov (1921) hingewiesen. Wenn alle Blätter der rankenartigen Sprosse von *Ipomea purpurea* und *Bryonia dioica* entfernt wurden, gewannen die neu entstandenen Blätter an der wachsenden Sproßspitze erst weniger xeromorphe Eigenschaften als die früher abgetrennten, höchst gestandenen Blätter aufgewiesen hatten. Die zu erwartenden Werte im Gradienten

der xeromorphischen Eigenschaften werden also durch diesen Eingriff geändert, und zwar im Sinne einer Verschiebung nach mehr hygromorpher Richtung. Dies sollte nach dem Verfasser durch die verbesserte Wasserversorgung (d. h. Ausschaltung des Wasserentzuges durch die unteren Blätter) bedingt sein. Später, wenn schon zahlreiche neue Blätter ausgetrieben sind, entwickelt sich aber unter dem Einfluß der neu entstandenen, Wasser verbrauchenden Blätter ein neuer, vollständiger Gradient. Zur Zeit kann dieses Experiment als schwerwiegendster Beweis für die Richtigkeit der ursprünglichen Zalenskyschen Auffassung angesehen werden.

Auf dem Gebiete der Pflanzenphysiologie wurden neuestens Angaben bekannt, die für die erwähnte Frage von ausschlaggebender Bedeutung sind. Die oberen Blätter weisen nämlich im allgemeinen mehrere physiologische Eigenschaften auf, die den konstitutionellen dürreresistenten oder den künstlich abgehärteten Pflanzensorten eigen sind. Als solche können z. B. der höhere osmotische Wert, höhere Plasmaviscosität, verstärkte Transpirations- und Assimilationsintensität und höhere Synthetisierungsfähigkeit betrachtet werden (Maximov 1952, Kurssanow 1941, Znamensky 1948).

In diesem Berichte sind unsere Untersuchungen zusammengefaßt, die die Frage behandeln, ob dieser erwähnte anatomische Gradient tatsächlich mit der Wasserversorgung in ursächlichem Zusammenhang steht. Es wurde geprüft, ob in den Werten des xeromorphischen Gradienten durch die Dürre eine Verschiebung erzielt werden kann, im Sinne einer Veränderung des Unterschiedes im Grade der Xeromorphie der oberen und der unteren Blätter.

Die Ausbildung der xeromorphischen Struktur hängt offenbar von verschiedenen Stoffwechselprozessen ab und hat auch demnach sich manifestierende Folgeerscheinungen. Es liegt also der Gedanke nahe, daß ein Gradient auch auf dem Gebiete der physiologischen und chemischen Eigenschaften zu beobachten ist. Wenn diese physiologischen Gradienten mit der Entwicklung der xeromorphischen Struktur in Zusammenhang stehen, können wir erwarten, daß auch deren Werte mit der Regelung der Wasserversorgung ebenfalls in einem mehr oder weniger ausgeprägten Grade verschoben werden.

Eine Untersuchung der anatomischen und physiologisch-chemischen Gradienten, von diesem erwähnten Gesichtspunkt aus betrachtet, kann zur Erkenntnis des xeromorphischen Charakters vieles beitragen.

B. Methoden.

Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Kulturpflanzen als kleinparzellige Feldversuche eingestellt. Über die trocken gehaltenen Parzellen stellten wir während der Nacht und der Regenperioden

Dächer auf. Andere Parzellen wurden in regelmäßigen Zeitabständen so bewässert, daß sie im Mittelwert eine dreifache Menge des vieljährigen durchschnittlichen Jahresniederschlages erhielten.

Der Wassergehalt wurde nach den üblichen Methoden bestimmt und in Prozent des Trockengewichtes ausgedrückt. Die Bestimmung des Wassersättigungsdefizites und die der Dimensionsquotienten erfolgte nach Stocker (vgl. Paech u. Simonis 1952).

Die Katalaseaktivität wurde nach Bach mit Peroxyd-Substrat und oxydimetrischem Titrieren, die Peroxydaseaktivität nach Bach u. Zbarsky durch die Oxydation des Pyrogallols (Purpurogallin) photometrisch bestimmt (vgl. Bjelozersky u. Proskuryakov 1952).

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde durch einen quantitativen alkoholischen Auszug nach der Methode von Godnev photometrisch vorgenommen (vgl. Bjelozersky u. Proskuryakov 1952). Die Ergebnisse sind als relative Werte angeführt.

Der Ascorbinsäuregehalt wurde in saueren Auszügen (Metaphosphorsäure) mit Dichlorphenol-Indophenol titrimetrisch bestimmt.

Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse. Die Tabellenwerte stellen die Mittelwerte und deren mittleren Fehler (m) aus 20 Einzelbestimmungen dar.

Die anatomischen Angaben sind im allgemeinen graphisch dargestellt. In jeder Versuchsserie wurden mehr als 50 anatomische Einzelmessungen ausgeführt, deren Mittelwerte in den Abbildungen aufgetragen sind. Gefundene m-Werte für die graphisch dargestellten Stomazahlmessungen $\pm$ 0,30—0,42, für die Stomalängeangaben $\pm$ 1,2—3,1.

C. Experimenteller Teil.

1. Über die Verbreitung des xeromorphischen Gradienten.

Unsere Untersuchungen wurden zuerst auf die Frage der Verbreitung des xeromorphischen Gradienten bei unseren Kulturpflanzen gerichtet. Das Vorhandensein des Gradienten konnte bei allen von uns untersuchten, hier angeführten Pflanzen festgestellt werden: *Hordeum sativum* v. *vulgare* L. *(Abyssinicum)*, *Hordeum distichum* L. (Imperial), *Avena sativa* L. (Algerible und Marne), *Linum usitatissimum* L. (Beta 106 und Concurrent), *Glycine hispida* (Mönch) Max. (Iregi Corona), *Lycopersicum esculentum* (Mill.) Hay. (San Marzano).

Diese Verhältnisse entsprechen völlig dem mesophytischen Charakter dieser Kulturpflanzen.

2. Die Eigenschaften des xeromorphischen Gradienten.

Für die Untersuchungen über die Eigentümlichkeiten des xeromorphischen Gradienten dienten Tomaten (besonders im vierblättrigen Entwicklungsstadium) als Versuchspflanzen.

Aus den Angaben der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß Stomazahl (relative Werte im mikroskopischen Gesichtsfeld) und Größe der Stoma- und Epidermiszellen sich nach der oben erwähnten Zalenskyschen Gesetzmäßigkeit ändern. Der Grad der Xeromorphie, charakterisiert durch diese quantitativen Merkmale, steigt aber nach oben nicht linear an, sondern zeigt eher einen S-förmigen Verlauf. Bei der Stomazahl ist der große Sprung zwischen den Werten der 2. und der 3. Insertion bemerkenswert. Die Abnahme der Epidermiszellengröße zeigt ein ähnliches Bild. Daraus wird der Zusammenhang zwischen diesen Eigenschaften offensichtlich, was an der Abb. 1 auch graphisch dargestellt ist. Wenn die Epidermiszellengröße mit den ihnen entsprechenden (an demselben Präparate zu findenden) Stomazahlwerten mehrerer Pflanzen auf einem gemeinsamen Grafikon aufgetragen sind, stellt sich heraus, daß die so erhaltene Gesetzmäßigkeit nicht einer Geraden, sondern einer wohl ausgeprägten Kurve entspricht.

Tabelle 1. *Gradienten der xeromorphischen Merkmale bei der Tomate in vierblättrigem Entwicklungszustand.*

Die Reihenfolge der Blätter von unten gerechnet	Stomazahl Relative Werte im mikroskopischen Gesichtsfeld	Stomalänge	Epidermiszellenlänge
1	16,6 ± 1,2	39,4 ± 2,3	107,6 ± 2,2
2	20,3 ± 0,9	35,0 ± 1,5	88,0 ± 2,0
3	41,6 ± 1,1	30,6 ± 2,1	59,0 ± 1,5
4	53,1 ± 1,5	28,4 ± 1,9	48,6 ± 0,8

Es kann aber auch die Frage gestellt werden, ob der Gradient der anatomischen Eigenschaften nicht nur einfach die Folge der ontogenetischen Entwicklung (Wachstum) sei? Man könnte nämlich annehmen, daß die quantitativen Werte der oberen Blätter einfach durch den mehr „embryonalen" Charakter dieser Organe (geringe Ausbreitung ihrer Blattoberfläche) grundsätzlich gut erklärt werden können.

Für die Entscheidung dieses wichtigen Problems wurden die erwähnten quantitativen Werte mit der Größe der entsprechenden Blattflächen verglichen. Auf der Abb. 2 sind diese Werte (Stomazahl, Epidermiszellengröße, Blattfläche) der vier Insertionsstellen aufgetragen. Die Zusammenhänge treten besonders klar hervor, wenn die Angaben mehrerer Versuchspflanzen unabhängig voneinander an einer gemeinsamen Abbildung dargestellt sind (es werden also nicht Durchschnittswerte angeführt). Deshalb wurden in Abb. 2 die Stomazahl, Epidermiszellengröße und Blattfläche von fünf Tomatenpflanzen aufgetragen. Die Abszisse zeigt die vier Insertionsstellen von unten gerechnet. Zu jeder Insertionsstelle gehören 5 Werte der verschiedenen Versuchspflanzen nach zunehmender Stomazahl geordnet. Die zu den einzelnen Blättern gehörenden Werte der Epidermiszellengröße und Blattfläche sind auf die Ordinate angeführt.

Es läßt sich leicht feststellen, daß weder die Zellgröße noch die Stomazahl mit dem Entwicklungsgrad der Blattoberfläche in irgendeinem Zusammenhang gebracht werden kann. Die Werte dieser zwei Merkmale zeigen eine regelmäßige Veränderung, und diese Regelmäßigkeit wird durch die großen Schwankungen der Blattflächengröße nicht gestört.

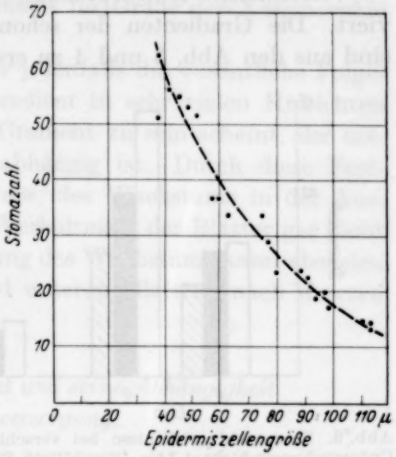


Abb. 1. Zusammenhang zwischen der Stomazahl und Epidermiszellengröße bei der Tomate im vierblättrigen Entwicklungszustand.

Im vierblättrigen Entwicklungszustand zeigt die Blattflächengröße eine trotz der großen Schwankungen der absoluten Werte gut bemerkbare Maximumkurve, wenn die Blattfläche als „Funktion" der Insertionsstelle dargestellt wird. Die anderen zwei Werte zeigen aber eine eindeutig sinkende bzw. steigende Tendenz. Die anatomischen Eigenschaften, welche den Grad der Xeromorphie bestimmen, hängen also in erster Linie von der Lage der Insertionsstelle des betreffenden Blattes ab und sind nur in sehr beschränktem Maße von dessen Oberflächenentwicklung beeinflußt.

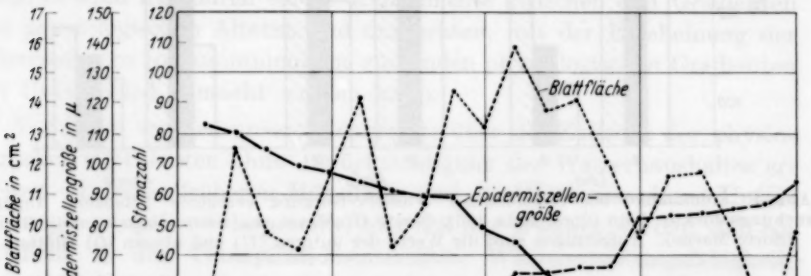


Abb. 2. Die einander entsprechenden Werte der Stomazahl, Epidermiszellengröße und Blattfläche bei der Tomate im vierblättrigen Entwicklungszustand.

Die echte xeromorphische Beschaffenheit des Gradienten wird noch durch jene Experimente bewiesen, welche sich mit seiner Abhängigkeit von der Wasserversorgung beschäftigen.

3. Die Abhängigkeit des xeromorphischen Gradienten von der Wasserversorgung.

Verschiedene Kulturpflanzen wurden bewässert und trocken kultiviert. Die Gradienten der schon erwähnten anatomischen Merkmale sind aus den Abb. 3 und 4 zu ersehen. Es werden die zahlenmäßigen

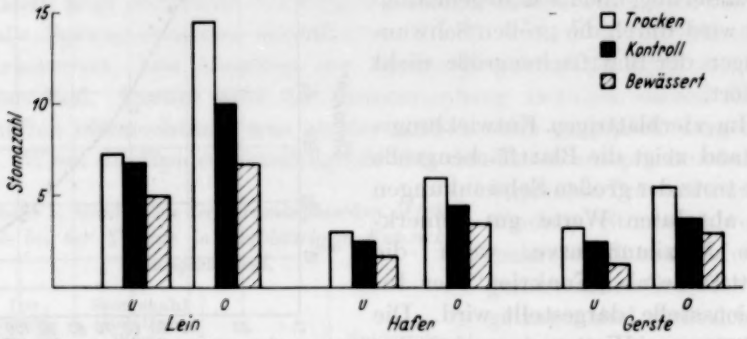


Abb. 3. Stomazahlverhältnisse bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Pflanzen. Untersuchungsobjekte: Lein (Sorte Beta 106), Gerste (*Hordeum sat.*, Sorte *Abyssinicum*), Hafer (Sorte Marne). Aufgetragen sind die Werte der unteren (*U*) und oberen (*O*) Blätter.

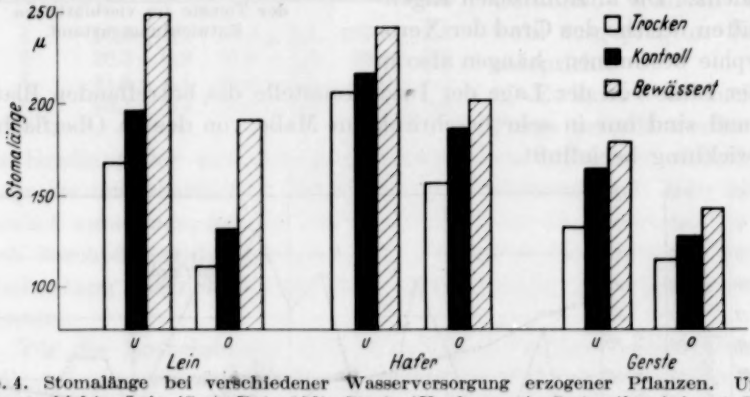


Abb. 4. Stomalänge bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Pflanzen. Untersuchungsobjekte: Lein (Sorte Beta 106), Gerste (*Hordeum sat.*, Sorte *Abyssinicum*), Hafer (Sorte Marne). Aufgetragen sind die Werte der unteren (*U*) und oberen (*O*) Blätter.

Angaben der „unteren" und „oberen" Blätter gegeben, worin ein Durchschnittswert der im Zeitpunkt der Untersuchung noch lebensfähigen untersten bzw. der schon gut entwickelten obersten Blätter zu verstehen ist. Wie schon früher nachgewiesen wurde, spielt die Größe der Blattoberfläche hinsichtlich des Gradienten keine entscheidende Rolle. Man könnte auch daran denken, daß die Blattzahl durch die verschiedene Wasserversorgung wesentlich verändert wird. Dieser Gedanke wurde aber durch die eingehende Untersuchung dieser Frage bei Tomaten und Leinpflanzen widerlegt, worauf später noch ausführlicher eingegangen wird.

Aus den Abb. 3 und 4 ist ersichtlich, daß tatsächlich Verschiebungen im Grade der xeromorphischen Gradienten erzielt werden konnten, im Sinne einer Veränderung der Unterschiede im Grade der Xeromorphie der oberen und unteren Blätter.

Aus diesen Ergebnissen können wir jedenfalls die wesentliche Folgerung ziehen, daß der anatomische Gradient in sehr vielen Hinsichten offenbar ein echter xeromorphischer Gradient zu sein scheint, der tatsächlich von der Wasserversorgung abhängig ist. Durch diese Feststellung wird die Rolle des Alterns bzw. des Wachstums in der Ausbildung der erwähnten anatomischen Verhältnisse der Blätter gar nicht in Abrede gestellt, die bloße Erscheinung des Wachstums kann aber den Unterschied zwischen den oberen und unteren Blättern nach unseren Untersuchungen kaum erklären.

4. Der physiologische Gradient und seine Abhängigkeit von der Wasserversorgung.

In der Einleitung wurde schon auf die Notwendigkeit hingewiesen, daß mit der Feststellung eines tatsächlichen xeromorphischen Gradienten auch die Ausbildung einiger dürreabhängigen physiologischen Gradienten angenommen werden kann (vgl. RAJHÁTHY 1950). Einige Beobachtungen über die Existenz von physiologischen Gradienten sind schon längst allgemein bekannt (ZNAMENSKY 1948, ALEXEJEV 1950), experimentelle Untersuchungen über ihre Dürreempfindlichkeit fehlen aber noch, obwohl nur durch solche Experimente zwischen den Gradienten des physiologischen Alterns und der echten, mit der Erscheinung der Dürreresistenz in Zusammenhang stehenden physiologischen Gradienten ein Unterschied gemacht werden kann.

Vor allem wurden unsere Kenntnisse über die Existenz der physiologischen Gradienten ohne Berücksichtigung des Wasserhaushaltes erweitert. In einer früheren Mitteilung sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen eingehend dargestellt, hier soll nur erwähnt werden, daß ein Gradient in der Transpirationsintensität, Wassererhaltungsfähigkeit, dem isoelektrischen Punkt der Cytoplasmaeiweißkörper, Oberflächenladung der Chloroplasten, Ca:K-Verhältnis, Konzentration der Ascorbinsäure gefunden wurde (FARKAS u. RAJHÁTHY 1952).

Zum weiteren Ausbau dieser Forschungen müßten wir, wie oben schon darauf hingewiesen wurde, auch den Zusammenhang zwischen den physiologischen Gradienten und dem Wasserhaushalt nachweisen. In einigen Fällen, wie z. B. bei den erwähnten Eigenschaften der Cytoplasmaeiweiße und Chloroplasten, brachten die Untersuchungen keinen Erfolg. Andere Gradienten zeigten aber bei den trocken und den bewässert kultivierten Pflanzen einen wohl ausgeprägten abweichenden Lauf.

Da nach den früheren Untersuchungen die erwähnten physiologischen Gradienten bei den vielblättrigen Pflanzen ziemlich gesetzmäßig verlaufen und in graphischer Darstellung, von kleineren Abweichungen abgesehen, meistens eine Gerade ergeben, sollten in den folgenden nur die extremen Werte (d. h. die der obersten und untersten Blätter) der Gradienten angeführt werden. Durch den Ausgangs- und Endpunkt der Gradienten werden seine Eigentümlichkeiten (Steilheit) sehr gut charakterisiert.

Der Wassergehalt nimmt von den unteren Blättern nach oben beständig ab, zeigt also einen fallenden Gradienten. Unter Dürrebedingungen läuft dieser Gradient weniger steil ab als bei guter Wasserversorgung. Die Steilheit des Gradienten der bewässerten Pflanzen wird durch den — gegenüber den trocken erzogenen Pflanzen — stark erhöhten Wassergehalt ihrer unteren Blätter verursacht, während der Unterschied bei den höheren Blättern nur sehr gering und nicht gesichert ist (Tabelle 2).

Das Verhalten dieses Gradienten scheint sehr charakteristisch zu sein, aber eine noch bessere Aufklärung über den Grad der Wasserversorgung gibt die Bestimmung des Stockerschen Wassersättigungsdefizites.

Das Wassersättigungsdefizit wird durch die Trockenheit erheblich gesteigert und zeigt einen ausgeprägten, steilen Gradienten mit höheren Werten bei den oberen Blättern (Tabelle 2). Die Richtung des Gradienten entspricht in großen Zügen der Verminderung des Wassergehaltes, kann aber nicht ausschließlich durch diese erklärt werden, da nämlich die oberen Blätter, obwohl sie im Wassergehalt kaum voneinander abweichen, in ihrem Sättigungsdefizit doch große Unterschiede aufweisen. Die oberen Blätter der trocken erzogenen Pflanzen sind also, auch bei einem gleichen Wassergehalt, in physiologischer Hinsicht mit Wasser nicht so gut versorgt wie die der bewässert kultivierten. Bei den unteren Blättern scheinen Wassergehalt und Sättigungsdefizit einander zu entsprechen.

Aus diesen Tatsachen können wir mit Recht folgern, daß während der Trockenperiode der Wassergehalt der oberen Blätter gegenüber den unteren relativ (!) erhöht wird, aber dieser erhöhte Wassergehalt reicht nicht aus, um den in noch größerem Grade erhöhten physiologischen Möglichkeiten der Wasseraufnahme zu entsprechen.

Um über die Ursachen dieser physiologischen Erhöhung der Wasseraufnahmefähigkeit etwas Näheres erfahren zu können, wurden auch die Dimensionsquotienten der Blätter nach Stocker untersucht.

Der Sukkulenzgrad (maximale aufnehmbare Wassermenge bezogen auf die doppelte Blattfläche) zeigt einen nach den oberen Blättern sinkenden Gradienten. In unseren Untersuchungen ändern sich die relativen Werte der maximal aufnehmbaren Wassermenge auch auf das

Trockengewicht bezogen nicht, da der *Hartlaubcharakter* (Trockengewicht/Oberfläche) bei allen Insertionsstellen annähernd konstante Werte aufweist, also kein Gradient des Hartlaubcharakters beobachtet werden kann (Tabelle 2).

Da der mit dem Sukkulenzgrad ausgedrückte Gradient der Wasseraufnahmemöglichkeit ein sinkender ist, kann mit ihm das erhöhte Sättigungsdefizit der oberen Blätter nicht erklärt werden.

Der dritte Dimensionsquotient, die *Oberflächenentwicklung* (Oberfläche/Frischgewicht) erscheint auch in Gradienten. Bei den oberen Blättern fällt eine größere Blattfläche auf die Einheit des Frischgewichtes. Durch die Dürre wird der Gradient nach höheren Werten verschoben, sein Charakter (Steilheit) bleibt aber unverändert. Dieser Umstand stellt uns den klaren Beweis dar, daß von einer durch verminderte Wasserversorgung hervorgerufenen Verminderung der Blattfläche nur im morphologischen Sinne gesprochen werden darf, da die physiologische Oberflächenentwicklung durch die Dürre sogar erhöht werden kann.

Die Änderung der Dimensionsquotienten durch die trockenen Umweltbedingungen scheint nicht bei allen bisher untersuchten Pflanzen eindeutig zu sein. Simonis (1952) berichtete kürzlich über ein abweichendes Verhalten seiner Versuchspflanzen. Nach unseren Untersuchungen können nicht nur bei dem von Simonis erwähnten Hartlaubcharakter, sondern auch bei Sukkulenzgrad und Oberflächenentwicklung Verschiedenheiten auftreten, da unsere bisher erreichten Ergebnisse gegenüber den seinigen, auf *Vicia faba* L. und *Rorippa nasturtium aquaticum* gewonnenen, gewissermaßen entgegengesetzt sind.

Tabelle 2. *Gradienten des Wassergehaltes bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Tomaten. Dimensionsquotienten.*

Untersuchte Zustandsgrößen	Untere Blätter					Obere Blätter				
	bewässert (B)	trocken (T)	Verhältnis $B:T$ $B=100\,\%$	Differenz $D=B-T$	σD	bewässert (B)	trocken (T)	Verhältnis $B:T$ $B=100\,\%$	Differenz $D=B-T$	σD
Wassergehalt in % des Trockengewichtes . . .	723 ± 13,7	531 ± 18,7	73	+ 392	23	414 ± 11,8	399 ± 55,8	96	+ 15	47
Wassersättigungsdefizit in %	14,9 ± 1,3	22,7 ± 1,6	153	− 7,8	2,0	25,8 ± 1,5	35,0 ± 2,2	136	− 9,2	2,4
Sukkulenzgrad	2,81 ± 0,12	1,84 ± 0,14	65	+ 0,97	0,18	1,84 ± 0,03	1,42 ± 0,14	77	+ 0,42	0,14
Oberflächenentwicklung . .	0,18 ± 0,003	0,29 ± 0,012	161	− 0,11	0,012	0,29 ± 0,005	0,39 ± 0,010	131	− 0,10	0,010
Hartlaubcharakter	0,66 ± 0,02	0,53 ± 0,03	80	+ 0,13	0,03	0,67 ± 0,03	0,53 ± 0,05	79	+ 0,14	0,05

Die Untersuchung von einigen Enzymaktivitäten. Von den Enzymaktivitäten wurde die der Peroxydase (Tabelle 3) und der Katalase (Tabelle 4) eingehender untersucht. Die Dürreempfindlichkeit der Kataleaseaktivität ist in der Literatur besonders betont (Zusammenfassung bei Crafts und Mitarbeitern 1949).

Der Gradient der Peroxydase- und Katalaseaktivität ist gut ausgeprägt. Im Gegensatz zu den Literaturangaben konnte aber eine Erhöhung der Katalaseaktivität in Trockenkulturen (ausgedrückt in ml des verbrauchten Peroxyds) nicht festgestellt werden (Tabelle 5). Der beobachteten kleinen Erhöhung der Peroxydaseaktivität (photometrisch bestimmt und in Extinktionen als relative Werte ausgedrückt) können wir auch keine große Bedeutung zuschreiben (Tabelle 5).

Tabelle 3. *Gradient der Katalaseaktivität bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Tomaten.*

Reihenfolge der Blätter von unten gerechnet	Aktivität der Katalase in ml des verbrauchten H_2O_2		Differenz $D=B-T$	σ_D
	bewässert (B)	trocken (T)		
4—5	$0{,}01 \pm 0{,}01$	$0{,}02 \pm 0{,}02$	$-0{,}01$	0,02
10—12	$0{,}16 \pm 0{,}02$	$0{,}10 \pm 0{,}02$	$+0{,}06$	0,03
18—20	$0{,}20 \pm 0{,}02$	$0{,}17 \pm 0{,}02$	$+0{,}03$	0,03
25—30	$0{,}22 \pm 0{,}01$	$0{,}24 \pm 0{,}01$	$-0{,}02$	0,01

Tabelle 4. *Gradient der Peroxydaseaktivität bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Tomaten.*

Reihenfolge der Blätter von unten gerechnet	Aktivität der Peroxydase (relative Werte in Extinktionen)		Differenz $D=B-T$	σ_D
	bewässert (B)	trocken (T)		
4—5	$0{,}37 \pm 0{,}02$	$0{,}46 \pm 0{,}03$	0,10	0,036
25—30	$0{,}29 \pm 0{,}02$	$0{,}31 \pm 0{,}03$	0,02	0,036

Tabelle 5. *Gradient des Chlorophyllgehaltes bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Tomaten.*

Reihenfolge der Blätter von unten gerechnet	Chlorophyllgehalt (relative Werte in Extinktionen)		Differenz $D=B-T$	σ_D
	bewässert (B)	trocken (T)		
4—5	$0{,}30 \pm 0{,}02$	$0{,}43 \pm 0{,}03$	0,13	0,036
10—12	$0{,}37 \pm 0{,}03$	$0{,}49 \pm 0{,}02$	0,12	0,036
18—20	$0{,}39 \pm 0{,}02$	$0{,}52 \pm 0{,}02$	0,13	0,028
25—30	$0{,}42 \pm 0{,}03$	$0{,}59 \pm 0{,}02$	0.77	0,036

Chlorophyllgehalt. In der Literatur sind verschiedene, einander entgegengesetzte Angaben über die Wirkung der Dürre auf den Chlorophyllgehalt verbreitet (Malkina-Krupnikova 1951, Hubbenet 1951). In unseren Versuchen war die dunkler grüne Farbe der Blätter in Trockenkulturen (außer den Tomaten auch bei zehn Lein- und Gerstensorten) auffällig.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Der Chlorophyllgehalt zeigt einen nach den oberen Blättern steigenden Gradienten. Die trocken kultivierten Pflanzen zeigen einen um 30% erhöhten Chlorophyllgehalt und der Lauf ihres Gradienten wurde steiler.

Ascorbinsäuregehalt. Der aus unseren früheren Mitteilungen und in Verbindung mit anderen Untersuchungen auch aus den Literaturangaben

bekannte Gradient des Ascorbinsäuregehaltes konnte auch mit der Wasserversorgung in Zusammenhang gebracht werden. Der Unterschied in der Reaktionsweise der oberen und der unteren Blätter war in diesem Falle so groß, daß die Gradienten eine merkwürdige Kreuzung aufweisen (Tabelle 6). Der Ascorbinsäuregehalt in den unteren Blättern wurde durch die Trockenheit wesentlich erhöht, der der oberen aber, wenn auch in geringem Maße, vermindert (nicht gesichert).

Tabelle 6. *Gradient des Ascorbinsäuregehaltes bei verschiedener Wasserversorgung erzogener Tomaten.*

Reihenfolge der Blätter von unten gerechnet	Ascorbinsäuregehalt in mg-%		Verhältnis $B:T$ $B=100\,\%$	Differenz $D=B-T$	σ_D
	bewässert (B)	trocken (T)			
4—5	176 ± 9,6	250 ± 8,0	142	+74	12,4
10—12	280 ± 8,1	310 ± 10,0	111	+30	12,9
18—20	365 ± 11,0	392 ± 7,6	108	+27	13,3
25—30	520 ± 7,1	503 ± 6,4	96	−17	9,5

Der Ascorbinsäuregehalt wurde früher als eine von dem Wasserhaushalt im wesentlichen unabhängige Eigenschaft betrachtet (Hamner 1949). Die neueren Ergebnisse der Stockerschen Schule (1947) weisen aber ebenfalls darauf hin, daß in dem C-Vitamingehalt (in erster Linie im Verhältnis der oxydierten und reduzierten Form) auch im Laufe eines Tages das Wasserdefizit große Schwankungen hervorrufen kann.

D. Besprechung der Ergebnisse.

Durch die oben dargelegten Ergebnisse wird die Hypothese über die xeromorphische Struktur der oberen Blätter wesentlich gestützt. Der Umstand, daß die oberen Blätter ein erhöhtes Wassersättigungsdefizit aufweisen, kann eine experimentelle, physiologische Begründung des in der Einleitung erörterten Begriffes des xeromorphischen Gradienten sein. Das schon unter normalen Bedingungen vorhandene höhere Wassersättigungsdefizit der oberen Blätter — im Vergleich zu den unteren — wird durch den Dürreeffekt noch mehr ausgeprägt.

Durch diese Bedingungen kann die entsprechende Verschiebung von mehreren physiologischen Gradienten verursacht werden. Sehr auffällig ist dieser Prozeß im Falle der Chlorophyllbildung. Die Erhöhung des Chlorophyllgehaltes durch die Dürre können wir auch mit bloßem Auge feststellen. Das Wasserdefizit wirkt somit auf die Chlorophyllbildung verstärkend. Wir müssen somit erwarten, daß in den oberen Blättern, in denen die Dürre das Wassersättigungsdefizit — mit den unteren verglichen — in noch stärkerem Maße erhöht, auch der Chlorophyllgehalt stärker erhöhen wird. Die ausführlich dargelegten Ergebnisse entsprechen völlig diesen Erwartungen.

In anderen Fällen scheint der Zusammenhang nicht so einfach zu sein. Das abweichende Verhalten der oberen und der unteren Blätter bei den Ascorbinsäurebestimmungen kann vorläufig noch nicht erklärt werden.

Jedenfalls können die mit dem Wasserhaushalt zusammenhängenden Gradienten die primären sein. Wenn die anderen physiologischen Gradienten jenen nicht völlig entsprechen, können wir annehmen, daß ihr enger Zusammenhang durch sekundäre Erscheinungen gestört wird. Als solche kann z. B. der verschiedene Alters- bzw. Entwicklungszustand der untersuchten Blätter betrachtet werden.

Dies gilt auch für die anatomischen Gradienten, worauf in der Einleitung in Zusammenhang mit den Untersuchungen von Alexandrov an *Ipomea* und *Bryonia* hingewiesen wurde. Die erwähnten Ergebnisse des russischen Forschers können auch mit der Auffassung gut vereinbart werden, wonach die Reduktion der Blattfläche eine bessere Wasserversorgung erzielen kann (Eckardt 1954). In diesem Fall ist also ebenfalls die Wasserversorgung der primäre Faktor, von dem die Ausbildung der anatomischon Struktur abhängig ist. Die Faktoren beeinflussen aber einander gegenseitig, so daß die jeweilige anatomische Struktur wiederum ihre Wirkung auf den Wasserhaushalt ausübt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind also immer von komplexer Natur. Entwicklungsgrad und Wasserversorgung der Blätter sind miteinander eng verbunden. Während der Entwicklung wird die anatomische Struktur verändert und mit dieser ist auch eine notwendige Veränderung der Eigenschaften des Wasserhaushaltes verknüpft. Die physiologischen und biochemischen Prozesse des Alterns spielen bei der Reaktionsweise der Blätter auch eine entscheidende Rolle. Dieser Umstand rechtfertigt die Erforschung der verschiedenen Gradienten bei der Untersuchung der Dürrewirkung, da die grundlegenden Verschiedenheiten in der Reaktionsweise der Blätter derselben Pflanze mit verschiedener anatomischer Struktur und verschiedenem physiologischem Zustand nur in dieser Weise in Erscheinung treten können.

Zusammenfassung.

Die oberen Blätter der Pflanzen weisen nach Zalensky eine im Vergleich zu den unteren mehr ausgeprägte xeromorphische Struktur auf. Als xeromorphische Merkmale kommen unter anderem Stomazahl und Zellgröße in Betracht. Die xeromorphische Struktur sollte durch die ungenügende Wasserversorgung der oberen Blätter entstehen.

Es wurden von uns Untersuchungen über den Gradienten dieser Struktur bei mehreren Kulturpflanzen ausgeführt und seine allgemeine Verbreitung festgestellt. Die Eigenschaften des Gradienten wurden bei Tomaten eingehender untersucht. Zwischen der Größe der Epidermiszellen und der Stomazahl ist ein strenger, aber nicht linearer Zusammenhang vorhanden. Der Gang des Gradienten ist von den Schwankungen der Blattgröße unabhängig, wird also nur von der Insertionshöhe des Blattes und nicht von seinem Wachstum beeinflußt.

Unter Dürrebedingungen wird die Verschiedenheit im Grade der Xeromorphie der oberen und der unteren Blätter im allgemeinen verändert, und zwar wird der Gradient oft steiler.

Mehrere Gradienten der physiologischen bzw. chemischen Eigenschaften wurden auch festgestellt. Einige dieser Gradienten (Wassergehalt, Wassersättigungsdefizit, Sukkulenzgrad, Chlorophyllgehalt, Ascorbinsäuregehalt) hängen auch von der Wasserversorgung ab.

Die Verschiebungen der physiologischen Gradienten können mit dem vielmehr primären Gradienten des Wassersättigungsdefizites in Zusammenhang gebracht werden. Der Verschiebungsgrad der physiologischen und chemischen Gradienten kann zu einer besseren Charakterisierung der Dürreeffekte dienen.

Literatur.

Alexejev, A. M.: Die Fragen des Wasserhaushaltes der Pflanzen. Probl. botaniki (Moskau) **1**, 298 (1950) [Russisch]. — Bjelozersky, A. N., u. N. I. Proskuryakov: Praktische Einführung in die Biochemie der Pflanze. Moskau 1951. [Russisch.] — Crafts, A. S., H. B. Currier and C. R. Stocking: Water in the Physiology of Plants. Chronica Botanica. Waltham, Mass. 1949. — Eckart, F.: Remarques sur le comportement physiologique des xérophytes pendant la période de dessèchement du sol. Rapport et communications. VIII. Congrès internat. de Botanique. Sect. **11—12**, 246 (1954). — Farkas, G. L., u. T. Rajháthy: Die Methoden der Züchtung dürreresistenter Pflanzensorten. Növénytermelés **1**, 5 (1952) [Ungarisch mit deutscher Zusammenfassung]. — Hamner, K. C.: Influence of environmental factors on the vitamin content of food plants. Biol. Progr. **1**, 313 (1949). — Hubbenet, E. R.: Die Pflanze und das Chlorophyll. Moskau 1951. [Russisch.] — Kurssanow, A. L.: Untersuchung enzymatischer Prozesse in der lebenden Pflanze. Adv. Enzymol. **1**, 329 (1941). — Malkina-Krupnikova, T. A.: Vergleichende physiologische Untersuchung xerophytischer und mesophytischer Pflanzen. Trudi Bot. Inst. Akad. Nauk. SSSR. **8**, 35 (1951). — Maximov, N. A.: Ausgewählte Werke. Dürre und Frostresistenz der Pflanzen. Moskau 1952. [Russisch.] — Paech, K., u. W. Simonis: Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Berlin 1952. — Prat, H.: Histophysiological gradients and plant organogenesis. Part. I. Bot. Rev. **14**, 603 (1948). Part. II. Bot Rev. **17**, 693 (1951). — Rajháthy, T.: Über die Methoden der Züchtung dürreresistenter Pflanzensorten. Növényterm. Kutató Int. Évk. **1**, 67 (1950). — Rasdorsky, K.: Pflanzenanatomie. Moskau 1950. [Russisch.] — Simonis, W.: Untersuchungen zum Dürreeffekt. Planta (Berl.) **40**, 313 (1952). — Stocker, O.: Das Wasserdefizit

von Gefäßpflanzen in verschiedenen Klimazonen. Planta (Berl.) **7**, 382 (1929). — Probleme der pflanzlichen Dürreresistenz. Naturwiss. **34**, 362 (1947). — Die Trockenresistenz der Pflanzen. Rapport et communications. VIII. Congrès internat. de Botanique. Sect. **11—12**, 223 (1954). — Zalensky, V. R.: Angaben über die quantitative Anatomie der verschiedenen Blätter derselben Pflanze. Izv. Kiev. politechn. Inst. **4**, 1 (1904) [Russisch]. — Über die Transpirationsintensität der höheren und unteren Blätter der Pflanzen. Izv. Saratovsk. s. Inst. **1**, 1 (1923) [Russisch]. — Znamensky, I. E.: Physiologische und biochemische Eigenschaften der Xerophyten. Trudi Bot. Inst. Akad. Nauk. SSSR. **6**, 93 (1948) [Russisch].

Dr. G. L. Farkas und Dr. T. Rajháthy, Forschungsinstitut für Landwirtschaft der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Martonvásár, Ungarn.

Planta, Bd. 45, S. 549—556 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Westf. Wilhelms-Universität Münster i. Westf.

ZUR FLUORESCENZMIKROSKOPISCHEN ANALYSE DES EXTRAFASCICULÄREN WASSERWEGES IN DER AVENA-KOLEOPTILE.

Von

S. Strugger und Th. Butterfass.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Januar 1955.)

Pohl (1954) untersuchte mit Hilfe des Fluorescenzmikroskops den extrafasciculären Wasserweg in der Avena-Koleoptile. Er benutzte durchfallendes Licht, arbeitete an Schnitten und zog Berberinsulfat und Natriumfluorescein als anzeigende Fluorochrome heran. Nach seinen Angaben erfolgt die passive Ausbreitung der Fluorochrome in der Basis der Koleoptile außerhalb der Leitbündel in den Membranen (vgl. Strugger 1938a, 1938b, 1939a, 1939b, 1949). In der Streckungszone dagegen fand er eine Ausbreitung durch die Protoplasten, wobei die Membranen nicht beteiligt sein sollen.

Da Pohl aus seinen Versuchen grundsätzliche Schlüsse in bezug auf den Wasserweg in der Avena-Koleoptile gezogen hat, erschien es wünschenswert, die Ergebnisse Pohls mit anderer Methodik (auflicht-fluorescenzmikroskopische Untersuchung, Intaktheit der Pflanzen während der gesamten Beobachtung und Heranziehung eines wesentlich geeigneteren Fluorochroms, des oxypyrentrisulfosauren Natriums) nachzuprüfen. Die Erfahrung hat bisher bei allen fluoroskopischen Transpirationsstromanalysen gezeigt, daß nur eine Beobachtung intakter Pflanzenteile im Auflicht-Fluorescenzmikroskop zu sicheren Ergebnissen führt. Das nachträgliche Schneiden bewirkt sehr häufig Veränderungen der Verteilung der Fluorochrome und ist daher als methodisches Hilfsmittel mit Unsicherheiten behaftet.

Als Fluorochrome benutzten wir das anodische oxypyrentrisulfosaure Natrium 1:100 in Leitungswasser (p_H-Wert der Lösung 7,2). Der Vorschlag Ziegenspecks (1945), diesen Farbstoff als Oxypyrengelb zu bezeichnen, ist wenig glücklich. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde das kathodische Berberinsulfat (Merck Nr. 1815) 1:100 in dest. Wasser (p_H 5,4) herangezogen. Hier muß bemerkt werden, daß die verschiedenen Präparate von Merck (neutrales Berberinsulfat Nr. 1815 und 1818: R_2SO_4, saures Berberinsulfat Nr. 1817: RH SO_4) und die verschiedenen Chargen in ihrer Löslichkeit und im p_H-Wert ihrer Lösungen

zum Teil bedeutende Verschiedenheiten zeigen[1]. Auch das Natriumfluorescein (Merck Nr. 3992) wurde angewandt, und zwar in Konzentrationen von 1:100 und 1:200 in dest. Wasser (p_H-Wert der Lösungen 9,6 bzw. 9,2). Dieser Farbstoff ist jedoch wegen seiner raschen Speicherung im Plasma der Parenchymzellen für die Analyse der Membranwegsamkeit weniger geeignet.

In der Wahl des Saatguts (Svalöfs Siegeshafer), der Anzuchtmethode und der Länge der Koleoptilen bei Versuchsbeginn (30—40 mm) hielten wir uns eng an die Angaben von Pohl (1953), doch hat sich bald als ausreichend erwiesen, die Koleoptilen in Sägemehl anzuziehen. Die Temperatur betrug 26 und 20° C. Dieselben Versuche wurden auch mit anderen Gramineen durchgeführt. Auch mit dekapitierten Koleoptilen haben wir experimentiert, wobei die Zeit zwischen Dekapitation und Versuchsbeginn variiert wurde. Die Ergebnisse waren in bezug auf den Wasserweg grundsätzlich bei allen Versuchen dieselben, so daß im folgenden nur auf die Versuche mit nichtdekapitierten Koleoptilen eingegangen werden soll.

Oxypyrentrisulfosaures Natrium.

Zunächst wurde mit ganzen Koleoptilen gearbeitet. Das Mesokotyl wurde etwa 2 cm unterhalb des Ansatzes der Koleoptile unter Wasser abgeschnitten. Nach dem Vorgehen Struggers (1938b) wurde die Schnittfläche in ein mit Farbstofflösung gefülltes kleines Röhrchen gestellt und mit Vaseline so abgedichtet, daß kein Anstieg an der äußeren Schnittfläche möglich war. Die Beobachtung erfolgte im Auflicht-Fluorescenzmikroskop. Die Koleoptile ist auf Grund ihres histologischen Baues für Auflichtuntersuchungen recht ungeeignet, wenn sie von außen her beobachtet wird. Der Farbstoff strömt in die Leitbündel zwar schnell ein, aber man kann nur ein diffuses Leuchtbild sehen, da die Leitbündel sehr tief liegen und die Epidermis sehr derb ist. Eine exakte Beobachtung der extrafasciculären Ausbreitung des Farbstoffes war mit dieser Methode nicht möglich. Daher wurde die Methodik verändert.

Mit der Röhrchenmethode wurde der Farbstoff an der basalen Schnittfläche geboten. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurde die Koleoptile dem Röhrchen entnommen und nach Abschneiden des Mesokotyls an der Koleoptilenbasis die Koleoptile an der Breitseite längs halbiert. Nach Entfernen des Primärblattes wurden die Hälften mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt, mit Paraffinöl und Deckglas überdeckt und im Auflicht-Fluorescenzmikroskop von der *Innenseite* her beobachtet. Läßt man den Farbstoff zunächst 10 bis 20 min aufsteigen und präpariert dann die Koleoptile, so kann folgendes beobachtet werden (Abb. 1). Da die Leitbündel in der Nähe der inneren Epidermis liegen, kann man die totale Durchströmung der Leitbündel deutlich erkennen. Die extrafasciculäre Ausbreitung in den Geweben

[1] Der Firma E. Merck danken wir für gegebene Auskünfte.

ist bereits in allen Zonen zu sehen. Sie erfolgt ausnahmslos in den Membransystemen, was bei der Beobachtung durch die zarte Innenepidermis klar zu belegen ist. (Die innere Epidermis weist Spaltenhydathoden auf, doch soll auf diese in einer besonderen Arbeit eingegangen werden.) Auch die Streckungszone zeigt außerhalb der Leitbündel nur fluorescierende Membranen, soweit sie durchströmt ist. Es

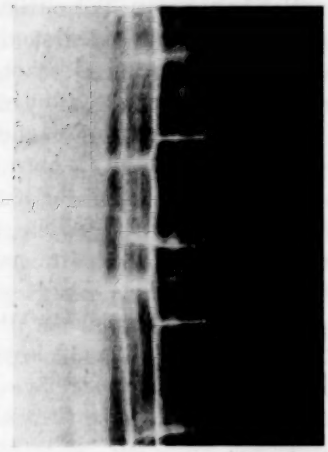


Abb. 1. Aufstieg von *oxypyrentrisulfosaurem Natrium* in die unversehrte, 32 mm lange Koleoptile. *Nach 20 min* wurde sie halbiert und von innen her mit dem Auflicht-Fluorescenzmikroskop beobachtet. Aufnahme 2 mm unterhalb der Spitze in Leitbündelnähe. Konzentrationsgefälle und Ausbreitung in den Parenchymmembranen sind deutlich zu sehen. Die Epidermis fluoresciert noch nicht. Maßstab 210:1. (Nicht abgebildet ist die Mittelzone, wo 15 mm von der Spitze ziemlich schwache, aber deutliche Ausbreitung des Fluorochroms in den Membranen zu sehen war. 30 mm von der Spitze, also an der Basis, erfolgte noch keine deutliche Ausbreitung.)

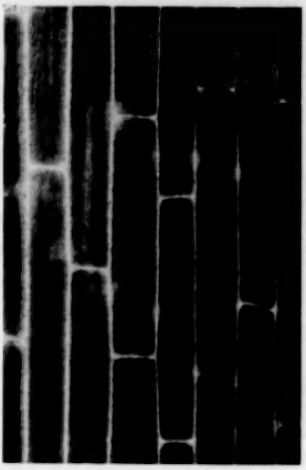


Abb. 2. Aufstieg von *oxypyrentrisulfosaurem Natrium* in die unversehrte, 30 mm lange Koleoptile. *Nach 2½ Std* wurde sie halbiert und von innen her mit dem Auflicht-Fluorescenzmikroskop beobachtet. Aufnahme der Epidermis 10 mm unterhalb der Spitze. Maßstab 210:1. (Von der Spitze bis herab in die Zone der Abb. 2 fluorescieren die Membranen fast in der ganzen Breite der Koleoptile intensiv. Je weiter man nach unten kommt, desto größer werden in den leitbündelfernen Teilen die Bereiche, deren Membranen noch nicht vom Fluorochrom durchströmt sind, bis in der Basiszone, 29—30 mm von der Spitze, nur noch das Leitbündel allein fluoresciert.)

ist deutlich ein Konzentrationsgefälle von den Leitbündeln in Querrichtung innerhalb der Parenchymmembranen nachweisbar.

An der Basis und in der Streckungszone ist die extrafasciculäre Ausbreitung langsamer als an der außen und innen mit Hydathoden ausgestatteten Spitze. Die Antiklinen der Innenepidermis fluorescieren an der Spitze schon nach einer halben Stunde in größerer Ausdehnung, während die Epidermisantiklinen der Basis erst nach etwa 2 Std und zunächst nur über dem Leitbündel aufzuleuchten beginnen.

Läßt man 2—3 Std lang aufsteigen (Abb. 2), so sind an der Spitze ziemlich alle Zellmembranen, soweit sie von innen her sichtbar sind, von

der Farblösung durchströmt. An der Basis ist diese Durchströmung noch nicht so weit fortgeschritten. Auch nach so langer Zeit verhalten sich alle Zonen in bezug auf die Membranleitung gleich.

Um die Ausbreitung des Fluorochroms in allen Phasen des Versuches direkt beobachten zu können, wurde die Methode noch weiter modifiziert. Die mit 1—2 cm des Mesokotyls unter Wasser abgeschnittene Koleoptile wurde unter Naßhalten der Schnittfläche von der Breitseite her längs halbiert, doch nur bis herab zum Ansatz des Mesokotyls. Nach Entfernen des Primärblattes und einer Hälfte der Koleoptile wurde die andere Hälfte mit der Innenfläche nach oben auf einen Objektträger gelegt, wobei die basale Schnittfläche des Mesokotyls in ein mit Vaseline umrandetes Farbstoffreservoir tauchte. Durch die Vaseline wurde eine kapillare Farbstoffausbreitung an der Oberfläche des Mesokotyls und der Koleoptile verhindert. Ein schmaler Klebestreifen verhütete das Abspreizen der Koleoptilenhälfte vom Objektträger.

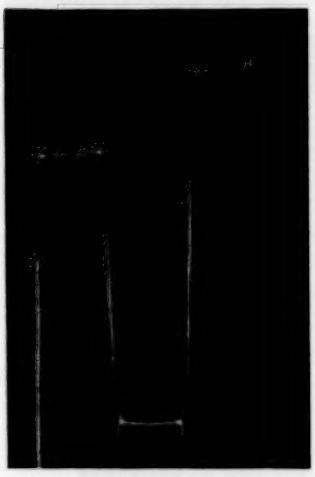


Abb. 3. Aufstieg von *neutralem Berberinsulfat* in die unversehrte, 34 mm lange Koleoptile. *Nach 3 Std 20 min* wurde sie halbiert und von innen her mit dem Auflicht-Fluorescenzmikroskop beobachtet. Aufnahme der Epidermis 6 mm unterhalb der Spitze. Maßstab 440:1. (Bis 10 mm abwärts von der Spitze fluorescieren fast alle Membranen der Koleoptile. 15—20 mm von der Spitze bleiben die leitbündelferneren Teile ungefärbt. In der Basiszone, 30—34 mm von der Spitze, ist eine Ausbreitung vom Leitbündel aus nur andeutungsweise erfolgt. In den Teilen der Koleoptile, in denen die Membranen angefärbt sind, zeigen bald auch die Kerne eine schwächere Fluorescenz.)

Bei dieser Anordnung kann man den ganzen Vorgang der fasciculären und extrafasciculären Ausbreitung bequem von Anfang des Versuches an studieren. Da der Wasserverlust des Präparates ziemlich hoch ist, kann die Ausbreitung höchstens etwa $^1/_2$ Std lang verfolgt werden. Das reicht aber aus, weil durch die verstärkte Transpiration die Wasserausbreitung begünstigt wird.

Das Fluorochrom schießt ziemlich rasch im Leitbündel hoch, und schon nach wenigen Minuten ergibt sich *in allen Teilen* der Koleoptile das typische Bild des *durch die Membranen* vom Leitbündel her einströmenden Farbstoffes.

Die Ergebnisse waren grundsätzlich dieselben, ob der Farbstoff vor oder erst nach der Halbierung geboten wurde. Daraus kann man schließen, daß das Halbieren keinen Einfluß auf die Art der Fluorochromausbreitung in den Geweben der Koleoptile ausübt.

Berberinsulfat reinst Merck Nr. 1815.

Mit Berberinsulfat wurden grundsätzlich dieselben Ergebnisse erzielt (Abb. 3). Auch dieser Farbstoff wurde nach den verschiedenen Metho-

den angewandt, und stets war Membranfärbung festzustellen, auch in der Streckungszone. Außerdem färbten sich sekundär die Kerne schwach an.

Natriumfluorescein Merck Nr. 3992.

Läßt man den Farbstoff vor der Halbierung aufsteigen, so erscheint es nachher in der Tat so, als ob er von Protoplast zu Protoplast gewandert sei. In den Membranen kann kaum eine Fluorescenz wahrgenommen werden und sie treten als dunkle Streifen zwischen dem helleuchtenden Protoplasma hervor. Halbiert man aber die Koleoptile vor dem Aufstieg, so erkennt man bei der Beobachtung leicht, daß das Bild zunächst genau dasselbe ist wie bei Verwendung von oxypyrentrisulfosaurem Natrium oder Berberinsulfat. Vom durchströmten Leitbündel aus wandert der Farbstoff *primär durch die Membranen* ins Parenchym ein. Gleich hinter der Farbspitze setzt aber die Speicherung durch das Plasma so rasch ein, daß die Membranen dadurch innerhalb weniger Minuten *sekundär entfärbt* werden. Am schnellsten verläuft dieser Vorgang in der Spitze, während bei fortdauerndem Farbstoffnachschub die Membranfärbung gegen die Basis zu wesentlich länger erhalten bleibt.

Protokoll über den Aufstieg von Natriumfluorescein in eine 33 mm lange, halbierte Koleoptile.

$18.^{24}$ Uhr. Das durch das Mesokotyl gebotene Fluorochrom strömt fasciculär in die Koleoptile ein.

$18.^{27}$ Uhr. Die Spitze der Koleoptile ist noch nicht ganz erreicht, doch beginnt 7 mm unterhalb von ihr bereits die Ausbreitung des Fluorochroms im Parenchym.

$18.^{28}$ Uhr. Die Spitze wird vom Farbstoffstrom erreicht.

$18.^{29}$ Uhr. $^1/_2$ mm unterhalb der Spitze beginnt die Ausbreitung im Parenchym, und zwar zunächst in den Membranen. Zur gleichen Zeit beginnt sie in der Mitte und an der Basis der Koleoptile.

$18.^{30}$ Uhr. Der Farbstoff hat an der Spitze und in der Mitte (15 mm von oben) vom Leitbündel her die Epidermis erreicht. Von der Mitte ab aufwärts beginnt in den tiefer gelegenen Schichten und dann auch in der Epidermis die Speicherung im Plasma.

$18.^{32}$ Uhr. 1 mm unterhalb der Spitze sind die Membranen der inneren Epidermis schon wieder ganz entfärbt. Es fluoresciert hier nur noch das Plasma.

$18.^{33}$ Uhr. In der Zone 15—20 mm von oben entfärben sich die Epidermismembranen.

$18.^{35}$ Uhr. An der Basis (28—33 mm von oben) erreicht der Farbstoff in den Membranen vom Leitbündel her die Epidermis.

Es konnte somit gezeigt werden, daß die durch den Transpirationsstrom bedingte extrafasciculäre Ausbreitung der angewandten Fluorochrome in der ganzen Avena-Koleoptile, also auch in der Streckungszone, in jedem Fall primär in den Membransystemen der Parenchymgewebe erfolgt. Pohl (1954) findet für die basale Partie der Koleoptile bei Anwendung des Berberinsulfats dasselbe Resultat, stellt aber als

Hauptergebnis seiner Untersuchungen den Befund heraus, daß die extrafasciculäre Ausbreitung der von ihm gebotenen Fluorochrome in der Streckungszone der Koleoptile durch das Plasma erfolgt. Die Ursachen für diese gegenteiligen Befunde lassen sich jedoch übersehen.

1. Die von Pohl (1954) angewandte Methodik ist für die Analyse der extrafasciculären Ausbreitung des Transpirationsstromes in Koleoptilen ungeeignet. Nur die auflicht-fluorescenzmikroskopische Beobachtung kann zu klaren Ergebnissen führen. Die Herstellung von Schnitten ist immer ein tiefer Eingriff, der bei der starken Speicherungsfähigkeit verletzter Protoplasten leicht zu Fehlschlüssen führen kann. Wir haben daher unter Zuhilfenahme der auflicht-mikroskopischen Beobachtung von der Innenseite der Koleoptile aus versucht, den Verlauf der Ausbreitung in allen Phasen des Versuchs am möglichst unverletzten Koleoptilengewebe zu beobachten.

2. Die Auswahl der Fluorochrome als Anzeiger für die extrafasciculäre Komponente des Transpirationsstroms ist in jedem Falle wichtig. Strugger (1938b) verwendete zunächst das saure Berberinsulfat. Dieser kathodische Farbstoff wird von den Membranen elektrostatisch gebunden und zeigt dadurch, freilich in eindeutig verlangsamter Form, die effektive Möglichkeit der Durchströmung der Membransysteme in den submikroskopischen Kapillaren an. Dabei hängt es sehr stark vom p_H-Wert der Farblösung ab, inwieweit sekundär auch der Protoplast das Berberinsulfat zu speichern vermag. Verletzte Protoplasten speichern es in jedem Falle sekundär sehr schnell. Strugger (1939b) führte für Transpirationsstromuntersuchungen das weitaus geeignetere saure Fluorochrom oxypyrentrisulfosaures Natrium ein. Dieser Farbstoff kann nur durch die submikroskopischen Kapillarsysteme der Membran laufen, weil er als sulfosaurer Farbstoff vom lebenden Protoplasma in kurzer Zeit nicht aufgenommen werden kann. Die Anionen des Farbstoffes sind außerdem gleich wie die Membran negativ geladen und können daher von der inneren Membranoberfläche nicht elektrostatisch gebunden werden, so daß eine reine Imbibitionsfärbung der Membranen während der extrafasciculären Ausbreitung vorliegt. Daher wird das oxypyrentrisulfosaure Na durch den Transpirationsstrom etwas schneller ausgebreitet als das kathodische Berberinsulfat, und man kann mit Recht annehmen, daß mit Hilfe des oxypyrentr. Na die reelle Geschwindigkeit der extrafasciculären Ausbreitung des Transpirationsstromes in den Membranen besser erfaßt werden kann. Versuche mit dem oxypyrentr. Na belegen lediglich die reelle Möglichkeit der extrafasciculären Ausbreitung des Transpirationsstromes in den Membransystemen. Inwieweit auch noch ein diosmotisches Durchwandern der Gewebe am Gesamtgeschehen der Wasserbewegung Anteil nimmt, ist damit noch nicht

entschieden. Im Sinne der erweiterten Kohäsionstheorie von STRUGGER entscheidet über diese beiden Möglichkeiten lediglich die Größe der Widerstände. Die beobachtete rasche Ausbreitung der Fluorochrome in den Membransystemen spricht eher für das Vorherrschen der Lokalisation der extrafasciculären Wasserbewegung in den Membransystemen.

Es ist sonach durch die vorliegenden Beobachtungen der Beweis erbracht, daß auch in der Streckungszone der Koleoptile das Membransystem der Parenchyme den möglichen Wasserweg außerhalb der Leitbündel darstellt. Die Versuche mit dem Natriumfluorescein haben fernerhin gezeigt, daß dieses Fluorochrom, welches leicht vom Cytoplasma gespeichert werden kann, primär ebenfalls durch die Membransysteme einströmt und erst sekundär sich durch Diffusion und Speicherung im Protoplasten ausbreitet.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe der Fluorochrome oxypyrentrisulfosaures Natrium, Berberinsulfat und Natriumfluorescein wurde die extrafasciculäre Ausbreitung des Transpirationsstromes in den Geweben der Avena-Koleoptile untersucht. Da an der ganzen Koleoptile von außen eine auflichtfluorescenzmikroskopische Beobachtung wegen der tiefen Lage der Leitbündel und der derben Ausbildung der Epidermis technisch nicht möglich ist, wurde entweder nach dem Farbstoffanstieg die Innenseite der längsgespaltenen Koleoptile im Auflicht untersucht oder der Farbstoffanstiegsversuch wurde an der längshalbierten Koleoptile durchgeführt, wobei gleichzeitig von der Innenseite her die Beobachtung erfolgte.

2. Alle drei Fluorochrome breiten sich primär mit dem Transpirationsstrom in den Membransystemen der leitbündelnahen Gewebe in allen Zonen der Koleoptile aus. In der Spitze erfolgt die Ausbreitung schneller als an der Basis. Das oxypyrentrisulfosaure Natrium kann vom lebenden Plasma nicht sekundär gespeichert werden und verbleibt infolgedessen in den Membransystemen. Das Berberinsulfat wird sekundär langsam vom Plasma gespeichert, breitet sich aber primär in den Membranen aus. Das Natriumfluorescein wird dagegen so schnell vom Plasma der Parenchymzellen gespeichert, daß die zunächst fluorescierenden Membranen rasch entfärbt werden.

3. Das Ergebnis von POHL, wonach in der Streckungszone der Koleoptilen die Ausbreitung der Fluorochrome primär durch das Plasma erfolgen soll, ist durch unsere Versuche widerlegt. Da POHL Schnitte untersucht und keine auflicht-mikroskopische Untersuchung vorgenommen hat, sind seine gegenteiligen Ergebnisse verständlich.

4. Es besteht sonach kein Anlaß, die erweiterte Kohäsionstheorie für die Streckungszone der Avena-Koleoptile einzuschränken.

Literatur.

Pohl, R.: Zur Reaktionsweise des Wuchsstoffes bei der Zellstreckung. Z. Bot. **41**, 343—372 (1953). — Die fluoreszenz-mikroskopische Analyse des Wasserweges in der Avena-Koleoptile. Z. Bot. **42**, 63—72 (1954). — Strugger, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora (Jena) **132**, 253—304 (1938a). — Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. I. Mitt. Die Methode und die ersten Beobachtungen. Flora (Jena) **133**, 56—68 (1938b). — Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 2. Die Eigenschaften des Berberinsulfats und seine Speicherung durch lebende Zellen. Biol. Zbl. **59**, 274—288 (1939a). — Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 3. Untersuchungen an Helxine Soleirolii Req. Biol. Zbl. **59**, 409—442 (1939b). — Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949. — Ziegenspeck, H.: Fluoroskopische Versuche an Blättern über Leitung, Transpiration und Abscheidung von Wasser. Biol. generalis (Wien) **18**, 254—326 (1945).

Prof. Dr. S. Strugger, Münster i. Westf., Botan. Institut der Universität.

Planta, Bd. 45, S. 557—572 (1955).

Aus dem Staatsinstitut für allgemeine Botanik in Hamburg.

MEHRJÄHRIGE VERSUCHE ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER KEIMUNG UND ENTWICKLUNG VON *POA ANNUA* DURCH BEHANDLUNG DER FRÜCHTE MIT WIRKSTOFFEN*.

Von

HANS SÖDING und MARGARETHE WAGNER.

(Eingegangen am 6. April 1955.)

A. Einleitung.

In einer früheren Arbeit (SÖDING, BÖMEKE und FUNKE 1949) hatten wir mitgeteilt, daß wir bei der Möhre *(Daucus Carota)* durch Einquellen des Saatgutes in verdünnten Wirkstofflösungen nicht unerhebliche Gewichtssteigerungen vor allem für die Wurzel erreichen konnten. Im Laufe siebenjähriger Versuche hatte sich dabei gezeigt, daß die günstigen Wirkungen nur dann eintraten, wenn die Pflanzen an einer wenigstens zeitweise schattigen Stelle standen. In praller Sonne war dagegen keine oder jedenfalls keine erhebliche Förderung durch die Wirkstoffbehandlung zu erzielen gewesen. Da es demnach für die Möhre als aussichtslos erschien, die an sich mögliche Ertragssteigerung auch in der Praxis auszuwerten, haben wir die Möhrenversuche nicht weiter fortgesetzt.

Als neue Versuchspflanze wählten wir *Poa annua*. Von dieser kleinen Pflanze lassen sich verhältnismäßig leicht größere Versuchsserien ansetzen. Ebenso kann man in einem Jahr zwei Versuche hintereinander machen. Außerdem ist es leicht, sich das nötige Saatgut selbst zu ziehen. Da die Pflanze jedenfalls selbstfertil ist, kann man durch wiederholte Samenzucht im Gewächshaus, womit wir bereits im Jahre 1945 begonnen hatten, genetisch ziemlich einheitliches Material bekommen. Schließlich hofften wir, etwa erhaltene günstige Ergebnisse einmal auf die Getreidearten ausdehnen zu können.

Wie an anderer Stelle (SÖDING 1952) bereits erwähnt, sind die ersten Versuche an *Poa annua* bereits von Frl. HOFFSCHLAG und zwar in den Jahren 1947 und 1948 durchgeführt worden, wobei sie dieselben Wirkstofflösungen wie wir benutzte. Sie hat dabei an dieser Pflanze Steigerungen des Sproßgewichtes von etwa 5—12%, an *Cardamine hirsuta* und *Arabidopsis Thaliana* solche bis zu etwa 25% beobachtet. Auch hat sie mit diesen oder ähnlichen Lösungen Keimversuche gemacht und dabei Keimungsförderungen festgestellt. — Wir suchten nun diese Ergebnisse zu bestätigen und auszubauen.

* Herrn Prof. F. LAIBACH zum 70. Geburtstag gewidmet.

B. Versuche über die Entwicklungsbeeinflussung.

1. Methodik.

Die Früchte von *Poa annua*, zu jedem Versuch Früchte von Schwesterpflanzen, wurden etwa 18 Stunden lang in Wirkstofflösungen, die Kontrollen ebenso lange in Leitungswasser, eingequollen. Als Wirkstofflösung diente vor allem die im folgenden als Comb bezeichnete, schon früher bei den Möhren benutzte Mischung.

β-Indolessigsäure (K-Salz) .	20 mg/Liter
Aneurin	0,2 mg/Liter
Askorbinsäure	40 mg/Liter
Oestron	0,2 mg/Liter
Nikotinsäureamid	1 mg/Liter
Koffein	0,2 mg/Liter.

Die Substanzen wurden einzeln, entsprechend konzentriert, in Leitungswasser gelöst und die Lösungen zusammengegossen, wobei sich das Oestron trotz Erwärmen nicht restlos löste. Mitunter wurden auch Hefeauszüge verwandt. Ein „10%-Hefeauszug" bedeutet, daß 10 g Bäckerhefe 20 Minuten in 100 cm^3 Leitungswasser gekocht, dann auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und filtriert wurde.

Anschließend erfolgte die Aussaat der Früchte in Tonschalen von 13 cm Durchmesser in feingesiebte und sorgfältig gemischte Komposterde, der in einigen Versuchen auch noch Sand zugesetzt wurde. Je Schale wurden bei Normalsaat 7, bei Dichtsaat 13 und bei Weitsaat nur 1 Pflanzstelle vorgesehen und mit je 4 Früchten beschickt. Nach 10—14 Tagen wurde dann auf 1 Pflanze je Pflanzstelle vereinzelt. Die Kultur der Pflanzen erfolgte zunächst im Gewächshaus, dann im Freien, wobei die Schalen in den Boden eingesenkt wurden, um Austrocknen zu vermeiden.

Bei der Ernte, die nach 2—3 Monaten erfolgte, wurden die Pflanzen über dem Boden abgeschnitten und das Sproßgewicht mit der Torsionswaage ermittelt sowie die Anzahl der Triebe festgestellt. Jede Versuchsserie bestand aus 20 Kulturschalen.

2. Ergebnisse.

Im Jahre 1949 wurden 2 Versuchsreihen, die eine am 12. Mai und die andere am 1. und 2. August, angesetzt. Als Wirkstofflösungen wurden die 3-fach konzentrierte Lösung Comb sowie ein 30% Hefeauszug benutzt. Um den Einfluß verschieden starken Lichtgenusses der Pflanzen zu ermitteln, erfolgte die Kultur teils in der Sonne, teils im Halbschatten und teils im Schatten. Außer der Normalsaat (s. oben) wurde Dicht- und Weitsaat angewandt, um einen etwaigen Einfluß der der Einzelpflanze zur Verfügung stehenden Nährstoffmenge festzustellen.

Im ganzen wurden mit der Lösung 3 · Comb je im Frühjahr und Sommer folgende Versuchsreihen angesetzt:

Sonne: Normalsaat,
Halbschatten: Dichtsaat, Normalsaat, Weitsaat,
Schatten: Normalsaat.

Zu diesen Versuchen trat im Sommer noch ein Versuch mit 30% Hefeauszug bei Halbschatten und Normalsaat.

In den *Frühjahrs*versuchen bei allgemein verhältnismäßig schwächlichen Pflanzen zeigte sich niemals eine günstige Wirkung der Behandlung; bei den beiden Serien Dichtsaat und Schatten, die zugleich die schwächlichsten Pflanzen lieferten, traten sogar Mindererträge von 15 bzw. 10% auf, die statistisch allerdings ganz ungesichert waren. Im *Durchschnitt aller 5 Frühjahrsversuche* ergab sich eine Ertrags*minderung* durch die Behandlung um 5,9% gegenüber den Kontrollen.

Bei den *Sommer*versuchen brachten die Serien in Sonne und Schatten keine Wirkung, die im Halbschatten Mehrerträge bis zu 11% bei 3·Comb Weitsaat und 18% bei 30% Hefe. Alle diese Differenzen sind bei großer Streuung der Einzelwerte statistisch aber nicht gesichert. Im *Durchschnitt der 5 Sommerversuche* mit der Lösung 3·Comb trat eine Ertrags*steigerung* von 5,0% durch die Behandlung auf, im Durchschnitt der 10 Versuche des *ganzen* Jahres demnach eine *Minderung* von 0,5%. Hieraus geht wohl klar hervor, daß, wenn überhaupt, höchstens unter ganz bestimmten Bedingungen günstige Wirkungen durch die Lösung 3·Comb zu erwarten sind, wogegen die 30% Hefe vielleicht eher wirksam sein könnte.

Die Wirkung auf die Bestockung der Pflanzen ging parallel mit der auf das Gewicht, sowohl bei den Förderungen als auch bei den Hemmungen, war aber meist geringer. So war z. B. bei der Serie mit 30% Hefe die Sproßzahl der behandelten Pflanzen um 11% höher (das Gewicht aber um 18%).

Da es uns nun auffiel, daß vielfach bei später schwächlichen Pflanzen nach der Wirkstoffbehandlung Mindererträge, bei später kräftigen aber Mehrerträge auftraten, vermuteten wir, daß für später schwächliche Pflanzen die Wirkstofflösungen vielleicht zu konzentriert gewesen seien, und benutzten im folgenden Jahre daher schwächere Lösungen, die Wirkstofflösung Comb und 10% Hefeauszug.

Im Jahre 1950 wurden im Frühjahr (3. und 4. Mai) und im Sommer (15. und 16. August) je folgende Versuche angesetzt:

Mit der Lösung Comb:

In Sonne: Normalsaat, im Halbschatten: Dichtsaat, Normalsaat und Weitsaat (Weitsaat nur im Sommer); im Schatten: Normalsaat.

Mit der Lösung 3·Comb: Im Halbschatten: Normalsaat.

Mit 10% Hefeauszug: In Sonne, Halbschatten und Schatten: Normalsaat.

In den *Frühjahrsversuchen* zeigte sich in Übereinstimmung mit dem Vorjahr im ganzen eher eine hemmende Wirkung der Behandlungen. Im *Durchschnitt aller 8 Versuche* ergab sich eine Ertrags*minderung* um 1,1% bei den mit Wirkstoffen behandelten Pflanzen (im Durchschnitt

der 3 Hefeversuche eine solche von 2,9%, im Durchschnitt der 4 Versuche mit der Lösung Comb eine Steigerung um 1,4%, während der Versuch mit 3·Comb eine Minderung von 5,9% brachte). Im übrigen erreichten die beobachteten Gewichtsdifferenzen niemals 9%; sie scheinen großenteils zufällig zu sein; es zeigt sich auch kein Einfluß von Sonne oder Schatten auf den Erfolg der Behandlung.

In den Sommerversuchen war das Bild wieder ein klein wenig günstiger. Das *Mittel aller* 9 Versuche brachte eine *Steigerung* um 2,3% bei den Wirkstoffserien (im Durchschnitt der 3 Hefeversuche eine solche von 2,2%, im Durchschnitt der 5 Versuche mit Comb eine Steigerung von 4,9% und bei der Lösung 3·Comb wiederum eine *Minderung* von 9,8%). In der Serie Comb ist am auffälligsten der Versuch mit Normalsaat im Halbschatten, der eine *Steigerung von 15,0% ± 5,5%* ergab. Der Minderertrag von 9,8% bei der Lösung 3·Comb ist wegen zu großer Streuung der Einzelwerte ganz ungesichert; alle anderen Gewichtsdifferenzen liegen unter 6% und sind wohl zufällig; wiederum ist ein Einfluß von Außenfaktoren oder der Saatdichte nicht erkennbar. Im Mittel der 17 Versuche dieses ganzen Jahres erhält man eine Steigerung des Gewichtes der Wirkstoffserien um 0,7%.

Es muß noch bemerkt werden, daß im Jahre 1950 im Gegensatz zum Vorjahr die Bestockung viel weniger durch die Wirkstoffbehandlung beeinflußt wurde. Bei der Serie Comb Normalsaat mit einer Gewichtssteigerung von 15% war sie ganz unverändert; die ungünstige Wirkung der Lösung 3·Comb zeigte sich allerdings auch in bezug auf die Bestockung. Vielleicht erklärt sich die sonst geringere Wirkung auf die Bestockung daraus, daß in diesem Jahre nur $^1/_3$ so konzentrierte Wirkstofflösungen benutzt worden waren.

Die stärkeren auch im Vorjahr benutzten Lösungen 3·Comb wirkten im Frühjahrs- und Sommerversuch 1950 schädigend, im Gegensatz zu 1949. Da, vor allem bei dem Sommerversuch, die Pflanzen im Jahre 1950 viel schwächer waren als 1949, ist es nicht ausgeschlossen, daß die Wirkstofflösungen für die später schwächlichen Pflanzen zu konzentriert gewesen sind. Es kann sich allerdings auch um einen Zufall handeln.

Zählt man *alle* Versuche (1949: 11; 1950: 17) zusammen, so erhält man *im Gesamtdurchschnitt eine Gewichtssteigerung der mit Wirkstoffen behandelten Pflanzen um 0,9%*. Läßt man die beiden „Treffer" (1949: + 18,3% bei 30% Hefe; 1950: + 15,0% bei Comb) weg, so ergibt sich eine Gewichtsminderung von 0,3% bei einer Gesamtzahl von 26 Versuchen mit über 1000 Kulturschalen. *Daraus geht eindeutig hervor, daß man mit dieser Methode im allgemeinen keine günstigen Erfolge bei Poa erhalten kann. Nur einzelne Treffer sind möglich.*

Von den beiden beobachteten Treffern beruht der eine (+ 18% ± 10,0% bei 30% Hefe) vielleicht auf Zufall, da er statistisch ganz ungesichert ist und sich die günstige Wirkung der Hefe im nächsten Jahre nicht bestätigen ließ. Der andere dagegen (+ 15,0% ± 5,5% bei Comb) könnte unseres Erachtens doch eine tatsächliche günstige Wirkung der Behandlung anzeigen oder vielleicht auch die Kombination einer solchen mit einem „glücklichen Zufall". Die übrigen Sommerversuche beider Jahre mit der Lösung Comb geben nämlich in der Regel ebenfalls kleine Gewichtssteigerungen, die übrigens auch Frl. Hoffschlag beobachtet hat; wir selbst (Söding, Bömeke und Funke 1949) beobachteten mit derselben Lösung bei der Möhre teilweise sehr günstige Wirkungen.

Im ganzen erhielten wir also einen oder zwei immerhin mögliche Treffer, aber 26 mehr oder minder ergebnislos verlaufene Versuche. Die durchgeführte Behandlung war demnach bei *Poa annua* im allgemeinen gar nicht oder nur schwach wirksam, wobei sowohl Förderungen als auch Hemmungen auftreten konnten, die aber meist nicht sehr erheblich waren. Höchstens ausnahmsweise, d. i. wohl unter besonderen im einzelnen noch ungeklärten Bedingungen, konnte sich eine stärkere Förderung ergeben.

C. Versuche über die Keimungsbeeinflussung.

Wir untersuchten nun die Frage, ob es möglich sei, durch Wirkstofflösungen wenigstens die *Keimung* der *Poa*-Früchte zu beeinflussen. Dabei beschränkten wir uns in erster Linie auf die Indolessigsäure (K-Salz) und die Askorbinsäure, über die beide positive Angaben in der Literatur, wenn auch für andere Pflanzenarten, vorliegen (vgl. S. 569).

1. Methodik.

Die Früchte, die für jeden Versuch wieder von Geschwisterpflanzen stammten, wurden eine halbe Stunde unter fließendem Wasser abgespült, zweimal mit doppelt destilliertem Wasser nachgewaschen und für durchschnittlich 20 Std in 50 cm^3 der Wirkstofflösung eingequollen. Sie waren dabei mit einem Rundfilter bedeckt, so daß sie von allen Seiten gleichmäßig benetzt wurden. Nach Abgießen der Wirkstofflösung wurden die Früchte noch dreimal mit doppelt destilliertem Wasser nachgewaschen und anschließend zu je Hundert in Petrischalen ausgelegt, deren Boden mit einer doppelten und deren Deckel mit einer einfachen Lage Filtrierpapier Schleicher & Schüll Nr. 598 bedeckt war, die gleichfalls mit doppelt destilliertem Wasser angefeuchtet wurden. Jede Versuchsserie bestand aus 5 oder 10 Schalen. Die Schalen standen in einem möglichst temperaturkonstanten Raum im Keller des Institutes auf dem Tisch (Tageslichtserien) oder in einem Zinkkasten (Dunkelserien). Im Abstand von meist 24 Std wurden die Versuche kontrolliert (die Dunkelversuche teilweise bei orangefarbenem Licht — Schottsches Filter OG2; 2,5 mm), die gekeimten Früchte entfernt und gegebenenfalls verdunstetes Wasser ersetzt.

Die beim Einquellen verwendeten Wirkstofflösungen wurden durch einen Phosphatpuffer (Gesamtkonzentration des Phosphates etwa 0,9%) auf ein p_H von etwa 5,5 eingestellt. Die Kontrollen wurden nur mit der Pufferlösung behandelt. Eine Beizung gegen Schimmelbefall wurde nicht durchgeführt; eine nennenswerte Neigung zur Schimmelbildung trat nicht in Erscheinung.

In einigen Versuchen wurden die Früchte auch 24 Stunden in doppelt destilliertem Wasser vorgequollen und dann in ein wirkstoffhaltiges Keimbett gebracht, das mit 6 cm^3 der gepufferten Wirkstofflösung angefeuchtet war.

Die Auswertung der Versuche erfolgte in der Weise, daß neben dem Keimprozent auch die durchschnittliche Keimdauer festgestellt wurde, die nach GASSNER (vgl. G. und BAUMGARTEN 1952) berechnet wurde (die durch die Gesamtkeimprozente dividierte Summe der Produkte von täglich abgelesenen Keimprozenten und dem Keimungstag). Wenn die Keimung der Früchte bis auf ganz vereinzelte Nachzügler abgeschlossen war, wurde der Versuch abgebrochen.

2. Ergebnisse.

Vorbemerkung über die Keimungsphysiologie von *Poa annua*.

Die Früchte von *Poa annua* keimen unmittelbar nach der Reife nur zu einem geringen Prozentsatz. Sie werden aber im Verlauf einiger Monate oft zu beinahe 100 Prozent keimfähig. Die Dauer der Nachreife schwankte bei den einzelnen Ernteproben sehr stark. Besonders lange dauerte die Nachreife bei den Ernteproben vom Oktober 1952, die selbst im folgenden Mai—Juni am Tageslicht noch nicht zu 20% keimten. In den Wintermonaten, vor allem im Februar 1953, geerntete Proben überholten in der Keimfähigkeit bald die Oktoberproben; schon nach 2 Monaten keimte die Probe von Ende Februar zu über 80%. Eine andere Probe mit verhältnismäßig langer Nachreife stammte vom Mai, mehrere mit kurzer Nachreife vom Juli. Die Ursache für dieses eigentümliche Verhalten muß einstweilen offen bleiben.

Während der Dauer der Nachreife bewirkte das Licht eine wesentliche Erhöhung des Keimprozents, das z. B. in einem Tageslichtversuch 85%, im entsprechenden Dunkelversuch (mit Kontrolle am Tageslicht) nur 25% betrug. Aber auch die Tageslichtkontrolle setzte im Vergleich zur Kontrolle mit orangefarbenem Licht das Keimprozent deutlich herauf, in einem Falle z. B. von 77 auf 96%. Je stärker das Tageslicht war, um so besser war auch die Keimung, was sich in gleichzeitigen Versuchen im hellen Laboratorium und im etwas dunkleren Keller zeigte. Auch an dem ältesten daraufhin untersuchten Saatgut (über 16 Monate) war der Lichteinfluß noch sehr deutlich, doch nahm er mit zunehmender Dauer der Nachreife immer mehr ab, und die Keimung erfolgte auch im Dunkeln zu immer höherem Prozentsatz. *Poa annua* verhält sich hier also ebenso wie die übrigen von MAIER (1932) untersuchten *Poa*-Arten. — Schließlich möge noch erwähnt werden, daß auch die durchschnittliche Keim*dauer* in unseren Versuchen stark schwankte, von etwa 4 Tagen bis zu über 3 Wochen. Durch Licht wurde sie *nicht* abgekürzt.

Es war also möglich, wenigstens die wichtigsten Versuche mit Saatgut von niedrigem und von hohem Keimprozent und von langer und von kurzer Keimdauer zu machen.

a) Versuche mit β-Indolessigsäure. Einquellen der *Poa*-Früchte mit dem Kaliumsalz dieser Säure, in Konzentrationen von 1 bis zu 800 mg/l, zeigte keinerlei klaren Einfluß auf das Keimprozent oder die Keimdauer.

Drei Versuche mit voll ausgereiftem, zu etwa 96% keimfähigem Saatgut, die im Dunkeln gehalten, aber am Tageslicht kontrolliert wurden, ergaben die Wirkungslosigkeit der benutzten Konzentrationen von 1 bis 100mg/l für die durchschnittliche Keimdauer; ein weiterer Doppelversuch mit Konzentrationen von 100 bis 800 mg/l brachte eine Erhöhung der Keimdauer von 0,1—0,2 Tagen in der höchsten Konzentration (Kontrollen 5,7 bzw. 5,5 Tage). Da die stärkeren Konzentrationen des Wirkstoffes bereits einen nennenswerten osmotischen Wert besitzen, wurde in der einen Reihe des Doppelversuches das Saatgut vor der Wirkstoffbehandlung erst 6 Stunden in doppelt destilliertem Wasser vorgequollen, um die Wassersättigung der Früchte zu sichern, doch ergab sich auch so nur die Hemmung in der höchsten Konzentration der Indolessigsäure. Von zwei weiteren derartigen Versuchen mit 6stündiger Vorquellung und mit schwächeren Konzentrationen zeigte der eine wiederum keine Wirkung des Wuchsstoffes, während bei dem andern allerdings eine Abkürzung der Keimdauer von maximal 0,3 Tagen (bei der Konzentration 20 mg/l) gegenüber der Kontrolle (Keimdauer 7,1 Tage) zu beobachten war.

Da bei dem bisher verwandten, zu über 95% keimenden Saatgut kaum eine klare Wirkung des Wuchsstoffes auf das Keim*prozent* erwartet werden konnte, wurden weitere Versuche mit schwach keimendem Material ausgeführt. Zwei Versuche mit Saatgut mit Keimprozenten zwischen 10 und 30% mußten, um noch wenigstens dieses Keimprozent zu erreichen, am Tageslicht ausgeführt werden; geprüft wurden Konzentrationen von 1—100 mg/l. Bei großen Schwankungen zeigte sich vielleicht eine geringe Beschleunigung der Keimgeschwindigkeit bei den Konzentrationen um 10 mg/l, aber keine Erhöhung des Keimprozentes. Zwei weitere Tageslichtversuche mit zu etwa 50% keimendem Saatgut ließen bei sehr langsamer Keimung, die erst nach 4—5 Wochen abgeschlossen war, überhaupt keinen Einfluß des Wuchsstoffes erkennen. Ein weiterer Lichtversuch mit Material von etwa 80% Keimfähigkeit und schneller Keimung (sie war nach 11 Tagen beendet) ergab eine *Hemmung* sowohl für das Keimprozent als auch für die Keimgeschwindigkeit bei allerdings unregelmäßigem Kurvenverlauf.

Schließlich wurden noch einige Dunkelversuche (mit Tageslichtkontrolle) mit noch nicht ausgereiftem Samenmaterial gemacht. Ein Versuch mit Saatgut mit einem Keimprozent von etwa 25% im Dunkeln, das 24 Tage für den Abschluß der Keimung erforderte, zeigte wiederum

keinen Einfluß des Wuchsstoffes. Zwei weitere Versuche mit Saatgut von etwa 60—70 bzw. 90% Keimfähigkeit und schneller Keimung gaben gleichfalls keinen Einfluß des Wuchsstoffes auf die Keimdauer zu erkennen. Das Keimprozent war im ersten Versuch etwas gesteigert, im zweiten eher etwas herabgesetzt (geprüfte Konzentrationen 1 bis 100 mg/l).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch eintägiges Einquellen des Saatgutes in Indolessigsäure $1:10^6$ bis $1:10^4$ und darüber weder eine Erhöhung des Keimprozentes noch eine Beschleunigung der Keimungsgeschwindigkeit erreicht werden konnte, weder im Licht noch im Dunkeln, weder bei nachgereiftem noch bei noch nicht nachgereiftem Saatgut, weder bei schnell noch bei langsam keimendem Samen. Gelegentlich beobachtete scheinbare Wirkung des Wuchsstoffes ließ sich bei Wiederholung der Versuche nicht bestätigen.

Tabelle 1. *Versuch vom 30. 9. 53.*

Indolessigsäurekonzentration	Durchschnittliche Keimdauer Tage	Differenz
1. Kontrolle	7,55	—
2. Kontrolle	7,79	—
1 mg/l	7,60	—
5 mg/l	7,48	0,07
20 mg/l	7,26	0,29
100 mg/l	7,01	$0{,}54 \pm 0{,}40$
200 mg/l	6,76	$0{,}79 \pm 0{,}32$
400 mg/l	6,88	$0{,}67 \pm 0{,}38$
800 mg/l	6,76	$0{,}79 \pm 0{,}30$

Abschließend wurde noch der Einfluß der Indolessigsäure geprüft, wenn sie im Keimbett selbst zugegen war (vgl. Methodik S. 562), also längere Zeit einwirken konnte. Zunächst wurden im Herbst 1953 drei Versuche am Tageslicht mit Saatgut ausgeführt, das anfänglich zu 40—50%, zuletzt zu 70—80% keimfähig war. Ein Einfluß des Wuchsstoffes auf das Keim*prozent* konnte bei allerdings sehr großen Schwankungen nicht festgestellt werden. Die durchschnittliche Keim*dauer* wies aber in allen Versuchen nur geringe Schwankungen auf und betrug bei den Kontrollen 7—7,75 Tage. Übereinstimmend zeigte sich eine Herabsetzung der Keimdauer um etwa einen halben Tag oder etwas mehr durch Konzentrationen von 100 mg/l oder höher. Als Beispiel sei *ein* Versuch wiedergegeben (Tabelle 1).

Bei der Berechnung der Differenz ist die für die Differenz ungünstigste Kontrolle zugrunde gelegt.

Man erkennt, daß sich die Werte hier zu einer gesetzmäßigen Kurve ordnen. Die Differenz erreicht zwar nicht den 3fachen mittleren Fehler, doch trifft auch das in je 1 Falle für die beiden anderen Versuche zu ($0{,}55 \pm 0{,}15$ für 100 mg/l und $0{,}60 \pm 0{,}20$ für 400 mg/l Indolessigsäure).

Es kann also kaum ein Zweifel sein, daß hier die Indolessigsäure in Konzentrationen von $1:10^4$ und darüber im Keimbett die Keimung von *Poa* beschleunigt hat. In 2 weiteren ebensolchen Versuchen im Februar — März 1954 und 55 mit zu über 95% keimenden Samen war die

Indolessigsäure aber ganz wirkungslos oder setzte sogar (in dem einen Versuch) in den hohen Konzentrationen von 400 und 800 mg/l die durchschnittliche Keimdauer um 0,8 bzw. 1,35 Tage herauf. — Vermutlich ist der verschiedene Ausfall der Versuche mit Wuchsstoff im Keimbett auf die verschieden weit fortgeschrittene Nachreife der Samen zurückzuführen.

b) Versuche mit Askorbinsäure. Mit Askorbinsäure wurden dieselben Versuche gemacht wie mit Indolessigsäure.

Eine Reihe von 7 *Dunkel*versuchen mit voll ausgereiftem Saatgut bei Kontrolle am Tageslicht zeigte wiederum keine deutliche Beeinflussung der Keimdauer (geprüfte Konzentrationen hier und im folgenden: 1—100 mg/l). Zwei weitere *Tageslicht*versuche mit Saatgut von 10—30% Keimfähigkeit ließen weder eine klare Wirkung auf die Keimdauer noch auf das Keimprozent erkennen. Sehr langsam keimende Saat mit etwa 50% Keimfähigkeit brachte in 2 Versuchen das gleiche Ergebnis, ebenso ein weiterer Tageslichtversuch mit schnell keimendem Saatgut von etwa 60% Keimfähigkeit. (Das Saatgut dieser und der folgenden Versuche stammte von denselben Proben wie bei den auf S. 563 genannten Versuchen). Es folgten drei Dunkelversuche mit Tageslichtkontrolle, teils mit langsam und teils mit schnell keimendem Saatgut von etwa 25 bis zu 90% Keimfähigkeit, aber nirgends war ein deutlicher Einfluß der Askorbinsäure auf das Keimprozent oder die Keimdauer vorhanden. Es wurde also in all diesen Versuchen dasselbe negative Ergebnis erhalten wie bei den entsprechenden mit Indolessigsäure. In hier nicht weiter angeführten Vorversuchen hatten wir aber den Eindruck einer gewissen Wirksamkeit der Askorbinsäure erhalten, wenn die Versuche bei schwachem Licht oder im Dunkeln gehalten wurden. Wir vermuteten daher eine Störung durch den Lichteinfluß bei der täglichen Kontrolle und nahmen in weiteren Dunkelversuchen diese daher bei orangefarbenem Licht (vgl. S. 561) vor. Es wurde mit schnell keimendem Saatgut von 20 bis zu 90% Keimfähigkeit gearbeitet; unter 7 Versuchen wurde nur in *einem* Versuch eine deutliche Erhöhung des Keimprozents (von 64% auf maximal 77% bei 100 mg/l) beobachtet. Die durchschnittliche Keim*dauer* wurde dagegen in wenigstens 3 Versuchen herabgesetzt. Hier war Saatgut von 40% Keimfähigkeit benutzt, das vor der Wirkstoffbehandlung erst 6 Stunden in doppelt destilliertem Wasser vorgequollen war, um gegenüber der osmotischen Saugkraft der Wirkstofflösungen die Wassersättigung der Früchte zu sichern. In diesen 3 positiv verlaufenen Versuchen sank die durchschnittliche Keimdauer bei einer Askorbinsäurekonzentration von 100 mg/l um durchschnittlich etwa 0,2 Tage (Tabelle 2). Die übrigen Versuche waren nicht zweifelsfrei zu beurteilen, doch zeigte sich jedenfalls keine Erhöhung der Keimdauer.

Abschließend wurden noch drei Versuche mit Askorbinsäure im Keimbett angestellt. 24 Stunden vorgequollenes Saatgut wurde in Keimschalen ausgelegt, deren Filtrierpapier mit 5 cm³ der gepufferten Askorbinsäurelösung angefeuchtet worden war. Täglich wurde 1 cm³ frisch zubereiteter gepufferter Wirkstofflösung nachgegeben, nachdem vorher etwas Flüssigkeit mit Filtrierpapier abgesaugt worden war. So sollte die dauernde Anwesenheit aktiver Askorbinsäure sichergestellt werden. Die Versuche wurden teils am Tageslicht, teils doch wenigstens bei Tageslichtkontrolle angestellt. Ein Einfluß auf das Keimprozent war bei zu über 95% keimendem Saatgut erwartungsgemäß nicht vorhanden. Die drei Versuche wiesen aber übereinstimmend, doch mehr oder weniger deutlich, auf eine geringe Abkürzung der mittleren Keimdauer um etwa 0,1 Tag bei der Konzentration von 20 mg/l hin. Die durchschnittliche Keimdauer betrug in diesen Versuchen etwa $5^1/_2$ Tage.

Tabelle 2. *Wirkung der Askorbinsäure auf die Keimdauer in drei positiv verlaufenen Versuchen.*

Versuche vom	Durchschnittliche Keimdauer in Tagen			
	Kontrolle	Askorbinsäure		
		50 mg/l	100 mg/l	200 mg/l
9. 12. 54	5,38	—	5,11	5,15
5. 1. 55	5,65	—	5,48	5,53
3. 2. 55	4,91	4,82	4,78	—

Der Wert für jede Kontrolle ist das Mittel aus 20, der für jede Askorbinsäurekonzentration das Mittel aus 10 Schalen mit je 100 Früchten.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß wenigstens in einigen Versuchen mit Askorbinsäure (bei im Dunkeln gehaltenen und in orangefarbenem Licht kontrollierten Einquellversuchen und bei Anwesenheit von Askorbinsäure im Keimbett) eine gewisse Tendenz zu einer geringen Abkürzung der Keimdauer vorhanden war.

c) Versuche mit Kombinationen von Wirkstoffen. Da Indolessigsäure und Askorbinsäure sich in der wachstumsfördernden Wirkung unterstützen (SCHEUERMANN 1952), machten wir noch einige weitere Versuche mit gleichzeitiger Einwirkung von beiden Wirkstoffen. Entweder wurde Indolessigsäure in der Konzentration 5 mg/l mit verschieden starken Askorbinsäurekonzentrationen kombiniert oder umgekehrt. Das Saatgut wurde in diesen Lösungen eingequollen. Die Keimfähigkeit betrug teils über 90%, teils etwa 55—80%, die mittlere Keimdauer $4^1/_2$—$6^1/_2$ Tage. Die Versuche mit dem ausgereiften Samen wurden im Dunkeln bei Tageslichtkontrolle, die übrigen im Tageslicht gemacht. Nirgends zeigte sich ein klarer Einfluß der Wirkstoffe.

Weiter setzten wir noch einen Versuch mit der auf S. 558 erwähnten Wirkstoffkombination Comb an. Die gepufferte Lösung wurde in abgestuften Konzentrationen von 3·Comb bis zu $^1/_4$·Comb verwandt. Das Saatgut (Keimprozent etwa 96) wurde wieder vorgequollen, der Versuch am Tageslicht ausgeführt. Die Behandlung erwies sich als

völlig wirkungslos (mittlere Keimdauer 4,1 Tag). Dasselbe war in 2 weiteren Tageslichtversuchen mit abgestuften Konzentrationen von Comb *im Keimbett* der Fall (Keimfähigkeit 90—95%; mittlere Keimdauer $5^1/_2$ Tage).

Abschließend wurden noch 2 Versuche mit gepufferten Hefeabkochungen (Konzentrationen 0,03%, 0,3%, 3% und 30%) gemacht, der eine, im Dunkeln, mit Einquellen des Saatgutes in die Wirkstofflösung, der andere, am Licht, mit den Hefeabkochungen im Keimbett. In beiden Fällen waren keine Wirkungen der Hefelösungen zu erkennen, ausgenommen die 30% Abkochung im Keimbett, die die mittlere Keimdauer um über 1 Tag heraufsetzte (Keimfähigkeit in diesen Versuchen 93—98%; mittlere Keimdauer $5^1/_2$—6 Tage).

Es ist auf den ersten Blick auffallend, daß bei den Kombinationsversuchen keinerlei Einfluß der Wirkstoffe sichtbar ist, während das bei den Versuchen mit Einzelwirkstoffen doch wenigstens teilweise der Fall war, besonders deutlich bei der Indolessigsäure im Keimbett. Dort waren aber die positiv verlaufenen Versuche alle mit Saatgut von 40—80% Keimfähigkeit gemacht, bei zu über 95% keimenden Samen zeigte sich dort ebensowenig ein Einfluß wie hier bei den Versuchen mit der Wirkstoffkombination. Da die Nachreife der Samen rasch fortschreitet, war es uns nicht möglich, auch diese Versuche mit Saatgut von mittlerer Keimfähigkeit zu machen. Beim Einquellen in Askorbinsäure zeigte sich eine deutliche Wirkung auch nur dann, wenn gleichzeitig mit solchem Saatgut und bei Dunkelheit bzw. orangefarbenem Licht gearbeitet wurde, was bei den Kombinationsversuchen nicht geschehen war. Der negative Ausfall dieser Versuche ist also nicht unverständlich, zeigt andererseits aber auch, daß durch einfache Kombination der genannten Stoffe keine positive Wirkung erzielt werden kann.

d) Versuche mit Aktivkohle. Ergänzend haben wir noch einige Tageslichtversuche mit Aktivkohle gemacht, da es nach den Ergebnissen von Borriss (1940), Keil (1939) und van Laer, Froschel und Vanderschueren (1942) mit Aktivkohle an Caryophyllaceen, am Apfel und an der Gerste als durchaus möglich erschien, daß man auch bei *Poa* durch Absorption aus der Laboratoriumsluft stammender, im Samen angereicherter Störstoffe (Borriss) oder auch sameneigener Hemmstoffe Keimungsförderungen erhalten könne. Die Samen wurden nach eineintägigem Vorquellen (6 Stunden in doppelt destilliertem Wasser, dann in der Pufferlösung) in ein Keimbett ausgelegt, das eine mit Filtrierpapier bedeckte angefeuchtete Schicht von Aktivkohle hatte. Bei *voll ausgereifter* Saat mit einem Keimprozent von 93% und höher wurde in 5 Versuchen *übereinstimmend* die Keimdauer um je etwa 0,2 Tage verkürzt, obwohl es sich bereits um an sich schnell keimendes Saatgut von einer mittleren Keimdauer von etwa 4 Tagen handelte.

Weitere 3 Doppelversuche mit noch nicht voll ausgereiftem Saatgut von 70 und mehr Prozent Keimfähigkeit, die vergleichend je teils bei hellem, teils bei gedämpftem Tageslicht angestellt wurden, zeigten wiederum *ausnahmslos* eine Verkürzung der Keimdauer, die meist etwa doppelt so groß war und zwischen 0,21 und 0,64 Tagen schwankte, aber keine Abhängigkeit vom Lichtgenuß erkennen ließ (mittlere Keimdauer hier 5—6 Tage). Das mittlere Keim*prozent* der mit Kohle behandelten Serien dieser 3 Versuche betrug 88,5% gegenüber 84,8% der Kontrollen. Es muß dahingestellt bleiben, ob es sich bei dieser Differenz um einen Zufall oder eine tatsächliche Wirkung handelt. Jedenfalls ist aber die Keimung von *Poa annua* leichter und sicherer durch Kohle zu beeinflussen als durch die in dieser Arbeit benutzten Wirkstoffe.

D. Besprechung.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, konnte sowohl die Keimung wie auch die spätere Entwicklung von *Poa annua* nur in Ausnahmefällen durch Behandlung der Früchte mit Wirkstoffen beeinflußt werden. Bei der Keimung war *niemals* eine größere oder auch nur zweifellos sichergestellte Erhöhung des *Keimprozents* vorhanden. Eine Abkürzung der *Keimdauer* wurde dagegen in mehreren Fällen beobachtet:

1. bei Indolessigsäure in Konzentrationen von 100 mg/l und mehr *im Keimbett* bei nicht voll nachgereiften Früchten;

2. bei *Einquellen* noch nicht voll nachgereifter Früchte in Askorbinsäure (100 mg/l), wenn während der Keimung das Tageslicht vollständig ausgeschaltet war;

3. bei Askorbinsäure (20 mg/l) *im Keimbett* (es wurden nur voll nachgereifte Früchte untersucht; hier und bei 2. ist die Wirkung nur gering);

4. bei Keimung in Anwesenheit von Aktivkohle im Keimbett an voll und besonders an noch nicht voll nachgereiften Früchten.

Offensichtlich sind also voll nachgereifte Früchte nur schwer, noch nicht voll nachgereifte dagegen etwas leichter zu beeinflussen. Da nur die *Keimungsgeschwindigkeit*, aber nicht das Keim*prozent* verändert werden konnte, ist zu schließen, daß die Keimung als solche, d. i. der Übergang von Ruhe zum Wachstum, von den Wirkstoffen überhaupt nicht beeinflußt wurde. *Diese sind also keine Keimungshormone.* Wohl aber beeinflussen sie, wenn auch nur in geringem Grade und unter bestimmten Bedingungen, das mit der Keimung verbundene Wachstum. — Gerade umgekehrt verhält sich offenbar das Licht, das das Keim*prozent* steigert und daher *keimungsauslösend* wirkt, aber die Keimdauer nicht abkürzt.

Von den vier genannten Wirkungen der von uns untersuchten Stoffe handelt es sich bei der letzten, der Wirkung der *Aktivkohle*, offenbar um

den Sonderfall der Wegnahme wachstumshemmender Stoffe, wobei es einstweilen offen bleiben muß, ob sameneigene Hemmstoffe oder aus der Laboratoriumsluft oder dem Farbanstrich stammende Störstoffe im Sinne von BORRISS (1940) vorliegen, die von den Früchten absorbiert werden. Die übrigen Wirkungen gehen auf Wachstumsbeeinflussungen durch die Indolessig- und die Askorbinsäure zurück, die beide ja auch das Wachstum des Haferkeimlings fördern (SCHEUERMANN 1952, v. GUTTENBERG u. WIEDOW 1952).

Die Wirkung der *Indolessigsäure* auf die Keimung ist bekanntlich umstritten. Während AMLONG u. NAUNDORF (1937—1939) eine Keimungsförderung durch *Einquellen* der Samen in solche Lösungen angeben, wirkt nach POPOFF (1941) der natürliche Wuchsstoff des Getreides sogar keimungshemmend. DRAWERT (1949) beobachtete bei *Cichorium*, Kohlarten, Mais, Weizen u. a. m. überhaupt keine Wirkung; nur unphysiologisch hohe Konzentrationen (0,001 mol und höher) verzögerten die Keimung. (Für weitere Angaben vgl. AUDUS 1953.) Die eigenen Ergebnisse mit *Einquellung* der *Poa*-Früchte in Lösungen von Indolessigsäure bestätigen vollauf die Angaben von DRAWERT über die Wirkungslosigkeit dieser Behandlung. Andererseits beschleunigt die Indolessigsäure im *Keimbett* die Keimung noch nicht voll nachgereifter Früchte. Sie ist also jedenfalls auch kein keimungshemmender Faktor, was ja auch aus den Einquellversuchen hervorgeht. Auch weist dies Ergebnis darauf hin, daß vor der Nachreife die optimale Wuchsstoffmenge für das Keimlingswachstum in den *Poa*-Früchten noch nicht anwesend ist. Die Nachreife selbst ist aber offenbar kein Wuchsstoffproblem, da das Einquellen noch nicht voll nachgereifter Früchte in Indolessigsäure ebenso wirkungslos bleibt wie das völlig nachgereifter. Auch BARTON (1940) hat an noch nicht nachgereiften Apfelkernen keine und an ebensolchen Ulmensamen nur eine unbedeutende Keimungsförderung durch Wuchsstoffe erreicht.

Auch über die *Askorbinsäure* liegen in der Literatur widersprechende Angaben vor. Nach HAVAS (1935) verursachte sie bei Weizen eine deutliche und bei Hafer eine geringe Keimungsförderung, während Tomaten- und Paprikasamen gehemmt wurden. FRANKE (1952) beobachtete eine geringfügige Steigerung von Atmung und Keimprozent bei *Sinapis*- und *Lepidium*-Keimlingen durch Vorquellen der Samen bei der Konzentration $1:10^6$; stärkere Lösungen waren wirkungslos oder schädigten. RUGE (1947) berichtet von einer fördernden Wirkung der Askorbinsäure auf die Keimung *alten* Hafers. In den eigenen *Poa*-Versuchen wirkte sie nur unter bestimmten Bedingungen (s. oben) in *geringem* Grade fördernd. Die Förderung trat vor allem bei Ausschluß des Tageslichtes auf, was vielleicht damit zusammenhängen könnte, daß bei Belichtung ausreichend eigene Askorbinsäure in den Früchten entsteht.

Obwohl also unsere Versuche an *Poa* zum weitaus überwiegenden Teil negativ verlaufen sind, so zeigen sie doch wenigstens grundsätzlich die Möglichkeit einer gewissen Beeinflussung des mit der Keimung verbundenen Wachstums durch die verwendeten Wirkstoffe.

Noch negativer sind aber unsere Versuche über die *Förderung der späteren Pflanzenentwicklung durch Einquellen der Früchte in Wirkstofflösungen* ausgefallen, indem 26 im wesentlichen ergebnislos verlaufenen Versuchsserien nur 1 oder 2 mögliche „Treffer" gegenüberstehen. Da auch bei der Keimung zweifellos gewisse Förderungen erzielt wurden, können unseres Erachtens diese Treffer, vor allem der mit der kombinierten Wirkstofflösung (vgl. S. 560), nicht ohne weiteres als Versuchsfehler angesehen werden, zumal positive Ergebnisse ja auch von uns mit derselben Lösung bei der Möhre und von zahlreichen anderen Autoren [vgl. die Literaturzusammenstellung bei KRUYT (1954) und bei SÖDING (1952)] mit anderen Lösungen erhalten worden sind. KRUYT ist auf Grund einer sehr sorgfältigen und umfassenden Untersuchung an Erbsenembryonen, die ohne Kotyledonen steril in Röhrchen gezogen wurden, zu positiven Ergebnissen hinsichtlich der Wirkung der Wuchsstoffe im Samenquellverfahren gelangt. Er bestätigte auch die ältere Erfahrung von der Verschiebung des Sproß:Wurzel-Verhältnisses durch Wuchsstoff zugunsten der Wurzel. Unsere fast rein negativen Ergebnisse an *Poa* entsprechen wiederum der schon früher gemachten Erfahrung, daß Gräser nur sehr schwer zu beeinflussen sind. Auch ist es wohl nicht ausgeschlossen, daß die sehr häufige *Poa annua* ihre Häufigkeit gerade einer optimalen Ausstattung mit Wirkstoffen verdankt und daher für unsere Untersuchungen trotz gewisser „technischer" Vorzüge doch ein recht sprödes und „undankbares" Objekt ist. Aber auch *Poa pratensis* hat in den Untersuchungen verschiedener Autoren auf eine Samenbehandlung mit Pudern von Indolbutter- oder Naphtylessigsäure oder handelsüblichen Wuchsstoffpräparaten nicht angesprochen, weder hinsichtlich der Keimung noch der späteren Entwicklung (vgl. die Zusammenstellung bei KRUYT).

In unseren Keimungsversuchen finden sich nun Hinweise, daß für den Erfolg der Wirkstoffbehandlung das Licht eine Rolle spielt. Diese letzte Erfahrung haben wir ebenfalls bei der Entwicklungsbeeinflussung von *Daucus* gemacht (SÖDING, BÖMEKE u. FUNKE 1949). Sie ist nicht unverständlich, da offenbar das Licht bei der Synthese wichtiger Wirkstoffe wie des Wuchsstoffes und der Askorbinsäure von Einfluß ist. Man müßte also, um exakte Versuche über die Entwicklungsbeeinflussung durch Samenbehandlung mit Wirkstoffen machen zu können, auch die Witterung des Versuchsjahres in der Hand haben. Aber auch das würde nicht genügen, sondern man müßte auch mit Samen arbeiten, die unter kontrollierten Bedingungen gebildet sind, da sich heraus-

gestellt hat, daß nicht nur die Keimung (Borriss 1940, vgl. S. 267), sondern auch die spätere Entwicklung und das Blühen der Pflanzen abhängig ist vom Wetter, unter dem die Samen gereift sind (vgl. die bei Bünning 1953, S. 476 angeführten Beispiele). Hätte man aber das Wetter (und natürlich auch die ebenfalls für den Wirkstoffwechsel wichtigen Bodenverhältnisse) in der Hand, so würde es unseres Erachtens bereits mit den jetzigen Mitteln vielleicht nicht unmöglich sein, eine Methode der Wirkstoffbehandlung der Samen auszuarbeiten, die unter bestimmten Bedingungen Erfolg brächte, wenigstens bei der einen oder anderen Pflanzenart.

Ob es einmal gelingen wird, auf diesem Wege zu einer Ertragssteigerung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen zu kommen, bleibt natürlich abzuwarten. Vielleicht führt auch ein indirekter Weg über eine Beeinflussung der Mutterpflanzen durch Düngung oder Wirkstoffzufuhr zur Zeit der Blüte zum Ziel [vgl. dazu Niggemann (1954) sowie die dort zitierte Literatur, der zufolge bei Getreide durch eine späte Stickstoffgabe an die Mutterpflanzen eine Ertragssteigerung im kommenden Jahre erzielt werden kann]. Weiterführen kann hier wohl nur sehr viel geduldige Kleinarbeit und Grundlagenforschung. Vor allem sollte auch die Aufnahme der Wirkstoffe nach dem Vorschlage Kruyts durch radioaktive Isotope verfolgt werden. Bei der Wichtigkeit der Frage nach der Ertragssteigerung für die menschliche Ernährung sollte kein Weg unversucht gelassen werden, der auch nur etwas Aussicht auf Erfolg bietet.

Zusammenfassung.

1. Es wurde versucht, durch Einquellen der Früchte in Wirkstofflösungen die Keimung und die nachfolgende Entwicklung von *Poa annua* zu beeinflussen. Dabei wurden β-Indolessigsäure und Askorbinsäure, allein oder in Kombination, auch unter Zusatz weiterer Wirkstoffe, sowie Hefeauszüge benutzt.

2. Es gelang nicht, das Keim*prozent* der *Poa*-Früchte zu erhöhen, auch nicht während der Nachreife. Indolessigsäure und Askorbinsäure sind demnach ohne unmittelbare Bedeutung für die Nachreife und den Übergang von Ruhe zum Wachstum.

3. Auch die durchschnittliche Keim*dauer* wurde in den *meisten* Versuchen nicht verändert. Vor allem war eintägiges Einquellen der Früchte in Indolessigsäure $1:10^6$ bis $1:10^4$ völlig wirkungslos, im Licht und im Dunkeln, bei nachgereiftem und noch nicht nachgereiftem Saatgut, bei schnell und bei langsam keimenden Früchten.

4. Eine *Abkürzung* der Keimdauer zeigte sich jedoch: a) um etwa einen halben Tag und mehr bei Anwesenheit von Indolessigsäure (100 mg/l oder mehr) im Keimbett bei *nicht voll nachgereiften* Früchten;

b) *tendenzmäßig* bei eintägigem Einquellen eben solcher Früchte in Askorbinsäure (etwa 100 mg/l), aber nur bei völliger Ausschaltung des Tageslichtes, sowie bei Anwesenheit der Askorbinsäure (20 mg/l) im Keimbett auch bei nachgereiften Früchten und ohne Ausschaltung des Lichtes.

Die Zugabe der genannten Wirkstoffe vermag also nur unter bestimmten Bedingungen das Keimlingswachstum in geringem Grade zu fördern.

5. Anwesenheit von Aktivkohle im Keimbett führte zu einer regelmäßigen Keimungsbeschleunigung, selbst an nachgereiften Früchten, jedenfalls durch Absorption von Hemm- oder Störstoffen.

6. Im übrigen schließt sich *Poa annua* keimungsphysiologisch als Lichtkeimer an das Verhalten der übrigen *Poa*-Arten an.

7. Eine deutliche Förderung der nachfolgenden Pflanzenentwicklung, gemessen am Frischgewicht der blühenden Pflanzen, wurde nach Einquellen der Früchte in Wirkstofflösungen nur in 2 von 28 Versuchen beobachtet. Der eine dieser beiden „Treffer" (30% Hefeauszug) beruht vielleicht nur auf Zufall, der andere ist vermutlich als Folge der Behandlung (mit einer kombinierten Wirkstofflösung) anzusehen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung eines Teiles der Versuche dieser Arbeit.

Literatur.

Amlong, H. U., u. G. Naundorf: Forschungsdienst **4**, 417; **5**, 292; **7**, 465 (1937—1939). — Audus, L. J.: Plant growth substances. London 1953. — Barton, L. O.: Contrib. Boyce Thompson Inst. **11**, 229 (1940). — Borriss, H.: Jb. wiss. Bot. **89**, 254 (1940). — Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953. — Drawert, H.: Planta (Berl.) **37**, 1 (1949). — Franke, W.: Planta (Berl.) **41**, 197 (1952). — Gassner, G., u. G. Baumgarten: Züchter **22**, 65 (1952). — Guttenberg, H. v., u. H. L. Wiedow: Planta (Berl.) **41**, 145 (1952). — Havas, L.: Nature (Lond.) **136**, 435 (1935). — Keil, J.: Jb. wiss. Bot. 88, 345 (1939). — Kruyt, W.: Acta bot. neerl. **3**, 1 (1954). — Laer, M. van, P. Froschel u. J. Vanderschueren: Instit. Nation. Industr. de Fermentation de Bruxelles, Communic. techniqu. de l'O. N. E. R. I. F. 1942. — Maier, W.: Jb. wiss. Bot. **77**, 321 (1932). — Niggemann, J.: Saatgut-Wirtschaft **1954**, Nr 5. — Popoff, A.: Angew. Bot. **23**, 254 (1941). — Ruge, U.: Planta (Berl.) **35**, 297 (1947). — Scheuermann, R.: Planta (Berl.) **40**, 265 (1952). Söding, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart 1952. — Söding, H., H. Bömeke u. H. Funke: Planta (Berl.) **37**, 498 (1949).

Prof. Dr. H. Söding, Hamburg 36, Staatsinstitut f. allg. Botanik.

Planta, Bd. 45. S. 573—590 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

DIE ENTWICKLUNG VON ZELLE UND KERN IM PROTONEMA VON FUNARIA HYGROMETRICA SIBTH.*.

Von

MARTIN BOPP.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangenen am 25. Februar 1955.)

Einleitung.

In immer steigendem Maße beschäftigt man sich heute damit, die Entwicklung des Zellkerns in seiner Beziehung zum Differenzierungsgeschehen der Zelle aufzuklären. Sowohl in normalen als auch in pathologisch veränderten Zellen pflanzlicher Objekte konnten auf diese Weise Kernveränderungen festgestellt werden, die offenbar in unmittelbarem Zusammenhang mit der Ausdifferenzierung der Zellen stehen, so zuletzt von HUSKINS u. STEINITZ 1948, TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA 1954, DEUFEL 1954, SALMON 1954, RESCH 1952, 1954; WOLL 1954a, b und andere. Es ließ sich vielfach zeigen, daß endomitotische Vorgänge (GEITLER 1938) daran beteiligt sind und der Grad der erreichten Polyploidiestufe für ein bestimmtes Gewebe einer Pflanze mehr oder weniger spezifisch sein kann, was aber meist keine Aussagen über den inneren Zusammenhang zwischen beiden zuläßt (HEITZ 1953). Außer der Polyploidisierung finden sich noch zahlreiche andere Veränderungen der Kerne, wie z. B. Vergrößerung oder Verkleinerung des Nucleolus, Abnahme der chromatischen Substanz, Pyknose, charakteristische Änderungen der äußeren Form usw. (Literatur bei TISCHLER 1934), die zweifellos mit der Ausdifferenzierung der Gewebe in Zusammenhang gebracht werden können.

Es ist bekannt, daß auch in bestimmten Teilen des Protonemas der Laubmoose die Kerne im Laufe ihres Lebens deutliche Veränderungen erleiden (WOESLER 1933, HÖFER 1928, v. WETTSTEIN 1953). Im folgenden soll untersucht werden, in welcher Weise diese Veränderungen im einzelnen verlaufen und welcher Zusammenhang zwischen ihnen und der Differenzierung der Zellen besteht. Weiterhin soll erörtert werden, ob sich Beziehungen zwischen Kernstruktur und Zellfunktion auffinden lassen.

Material und Methode.

Die Untersuchungen wurden im wesentlichen an den Caulonemen von *Funaria hygrometrica* Sibth. durchgeführt. Man versteht darunter (SIRONVAL 1947) den

* Ein Auszug wurde auf der internat. Botanikertagung Paris 1954 referiert.

Rhizoiden ähnliche Fäden des Protonemas, die im Unterschied zu diesen nicht positiv geotrop wachsen. Sie zeichnen sich gegenüber dem übrigen Protonema aber wie die Rhizoiden dadurch aus, daß sie schiefe Querwände besitzen und im Laufe ihrer Entwicklung Bräunung der Wände eintritt. Die Anordnung der Zellen in jeweils nur einer Reihe erlaubt leicht eine Rekonstruktion der Entwicklungsgeschichte jedes einzelnen Kerns, die auffallend gleichmäßig verläuft, so daß ohne weiteres verschiedene Caulonemen miteinander verglichen werden können.

Zelle und Kern wurden sowohl lebend im Phasenkontrastmikroskop als auch fixiert und gefärbt untersucht. Die Fixierung erfolgte mit Alkohol-Eisessiggemisch 3:1, die Färbung mit Essigcarmin, Lichtgrün und der Nuclealreaktion nach Feulgen mit einer Hydrolysedauer von 5—6 min. Während Essigcarmin erst nach mehreren Tagen zu einer ausreichenden Färbung führt, reichen bei Lichtgrün schon wenige Minuten für eine gute Tinktion aus. Um die verhältnismäßig kleinen Objekte gut handhaben zu können, erfolgte die Fixierung und die Färbung in den Kulturschalen auf dem Agar. Erst zur Beobachtung wurden die Protonemen auf den Objektträger übertragen.

Das Zeiss-Standardmikroskop stellte die Deutsche Forschungsgemeinschaft zur Verfügung, der ich dafür vielmals danke. Ebenso danke ich Herrn Dr. A. RESCH für wertvolle Hinweise.

Untersuchungsergebnisse.

a) Entwicklung von Kern und Nucleolus in den Caulonemen. Die Caulonemen bieten ein besonders übersichtliches und günstiges Untersuchungsobjekt. Ihre Differenzierung ist außerdem sehr viel weitgehender als die des Chloronemas. Aus diesem Grunde sei ihre Entwicklung als Paradigma vorangestellt. Die Beziehungen zur Entwicklung der Chloronemen werden im Anschluß behandelt.

Bei normaler Entwicklung eines Moosprotonemas besitzen alle Teile ein ausschließliches Spitzenwachstum, so daß die vorderste Zelle in jedem Fall die jüngste ist. Das trifft auch für die Caulonemen zu. In dieser Spitzenzelle findet sich ein kugelförmiger Kern mit einem sehr großen Nucleolus, ebenso wie in den Scheitelzellen der Moospflänzchen (HEITZ 1925, HÖFER 1928). Der Nucleolus ist stark „vacuolisiert" mit einer auch im Leben gut zu beobachtenden fast wabigen Struktur (Abb. 1), wobei die „Vacuolen" durchaus nicht immer rund sind. Dieser Zustand des Nucleolus hängt mit dem starken Plasmawachstum zusammen, das nahezu vollständig auf die Spitzenzelle beschränkt ist. Ob es allerdings zu einem Austritt geformter „Vacuolensubstanz" aus dem Nucleolus in den Kern oder ins Cytoplasma kommt, wie dies für die Pflanzen neuerdings wieder von WOLL (1954) bei den Nährzellen von Gallen beschrieben wurde (vgl. auch LINSBAUER 1932, VOGT 1947, ALTMANN 1949), konnte weder an lebendem noch an fixiertem Material festgestellt werden. Es wurden jedoch in einigen Fällen an lebenden Zellen längere Zeit Kanäle zwischen den „Vacuolen" und der Nucleolusoberfläche beobachtet, die aber ohne Veränderungen blieben, so daß ein Stofftransport durch diese Kanäle nur angenommen, nicht aber bewiesen werden kann.

Mit Lichtgrün- und Carminfärbung bleibt der Kern der Spitzenzelle ungefärbt, während der Nucleolus, bis auf die farblosen „Vacuolen",

dunkel erscheint. Bei Anwendung der Feulgenreaktion ist der Kern in der Spitzenzelle mit Ausnahme des Nucleolus schwach rosa gefärbt. Distinkte, stärker gefärbte Bestandteile finden sich dagegen nicht.

In Abb. 2 sind die Größenverhältnisse für die Weiterentwicklung von Kern und Nucleolus dargestellt. Die Werte sind die aus den gemessenen Größen von Länge und Breite sich ergebenden Flächenwerte und gelten nur als ungefähre Angaben an Stelle der nicht genau zu ermittelnden Volumgrößen. Während im angegebenen Bereich eine laufende Größenzunahme des Kerns festzustellen ist, nimmt das Nucleolusvolumen rasch ab und erreicht durchschnittlich in der 3. Zelle seine endgültige Größe. Diese Größenabnahme geht vor allem auf Kosten der „Vacuolen", die sich bis zur 4. Zelle allmählich verkleinern, dann vollständig verschwinden und von der 7. Zelle an nie mehr zu beobachten sind.

Abb. 1. Kern und Nucleolus in einer Spitzenzelle. Kernmembran kaum zu erkennen, Vacuolen im Nucleolus deutlich sichtbar. Vergr. etwa 800:1.

Durch die rasche Nucleolusverkleinerung, der nur eine langsame Vergrößerung des übrigen Kernraumes parallel geht, nimmt das Gesamtkernvolumen bis zur 3. Zelle etwas ab. In der Kurve sind die Nucleoluswerte von den Kernwerten in Abzug gebracht, wodurch die dauernde Kernvergrößerung zum Ausdruck kommt.

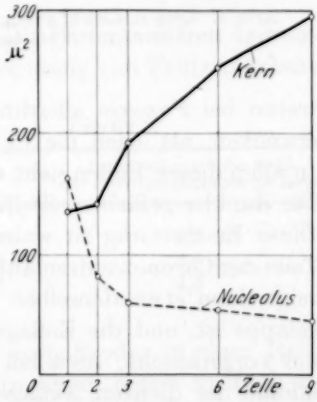


Abb. 2. Kurve der Kern- und Nucleolusfläche in der 1. bis 9. Zelle eines Caulonemas.

Im Verlauf dieser Entwicklung zeigt der Nucleolus ebenfalls etwa von der 7. Zelle an mit Essigcarmin dunkler färbbare Auflagerungen, während die Feulgenfärbung einige zunächst noch kleinere, später größere feulgenpositive Körper auf seiner Oberfläche erkennen läßt. Der Nucleolus selbst erscheint dann als vollkommen ungefärbter Hof innerhalb des im übrigen schwach gefärbten Kernraumes. Diese dem Nucleolus aufgelagerten Körper sind meist in Dreizahl vorhanden, seltener sind 2 oder 4 sichtbar (Abb. 3a). Liegen drei vor, so ist einer davon häufig mehr oder weniger gespalten. Diese Körper sind als Chromocentren anzusprechen. JACHIMSKY (1935) hat bei anderen Moosen die Natur von Körpern, die ebenfalls dem Nucleolus außen anliegen und in denselben Zahlen auftreten, als

heterochromatische Chromosomenanteile (HEITZ 1928) beschrieben und betont, daß eine Spaltung solcher dem Nucleolus aufgelagerten Chromocentren möglich ist. Umgekehrt erwähnt SCHEUBER (1932) auch die Verschmelzung mehrerer kleiner „bodies", so daß niedrigere Zahlen als 4, die sie für *Timmia* angibt, vorkommen können. Nach MILOVIDOV (1940), der diese feulgenpositiven Körper für *Fontinalis* nachweist, befinden sie sich immer an der Nucleolusoberfläche. Es

Abb. 3a.

Abb. 3b.

Abb. 4.

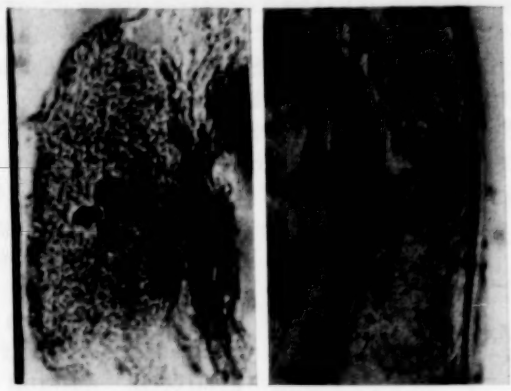
Abb. 3a. Langgestreckter Kern mit großen, dem Nucleolus aufgelagerten Chromocentren (18. Zelle eines Caulonemas). Vergr. 800:1.

Abb. 3b. Nucleolus mit scheinbar eingelagerten Chromocentren (s. Text). Vergr. 800:1.

Abb. 4. Kern mit leicht gelapptem Nucleolus. Lebendbeobachtung (7. Zelle eines Caulonemas). Vergr. etwa 1000:1.

treten bei *Funaria* allerdings Bilder auf (Abb. 3b), die den Anschein erwecken, als seien die Chromocentren in den Nucleolus eingelagert. In allen diesen Fällen sieht der Nucleolus so aus, als sei er stark gelappt. Die dunkler gefärbten Stellen liegen jeweils in der Mitte dieser Lappen. Diese Erscheinung ist wahrscheinlich so zu erklären, daß die äußeren Teile der Chromocentren aufgelockert oder verquollen sind, ihre Färbung zeigt dann etwa denselben Grad wie der Nucleolus, der folglich nicht gelappt ist, und die Einlagerung der Chromocentren in diesen ist also nur vorgetäuscht. Auch bei Lebendbeobachtung erscheint der Nucleolus infolge der dichten Auflagerung der Chromocentren in dieser Region meist deutlich gelappt, in extremen Fällen sogar amöboid (Abb. 4). Eine solche Form behält er über eine längere Reihe von Zellen bei. Etwa von der 20. Zelle an (die Entfernung von der Spitze schwankt in diesem Falle allerdings stärker als in den übrigen) verschwindet der Nucleolus. Die bisher aufgelagerten DNS-haltigen Chromatinstücke liegen dann frei im Kernraum. Dieser Zustand entspricht dem früher als „Zerfall

des Nucleolus in alten Zellen" beschriebenen (BOPP 1954b, u. a.). Der Eindruck von Bruchstücken wird vor allem dadurch bewirkt, daß den Chromocentren zunächst wohl noch Teile des Nucleolus anhaften, die



a b

Abb. 5a u. b. a Nucleolus verschwindet, Chromocentren bleiben isoliert übrig, behalten aber ihre ursprüngliche Lage noch bei (15. Zelle eines Caulonemas). Vergr. 800:1. b Nucleolus vor längerer Zeit verschwunden, Chromocentren in einer Reihe angeordnet (sehr alte Caulonemazelle). Vergr. 800:1.

mit der vielfach angewandten Carminfärbung sich von den Chromocentren nicht unterscheiden lassen, und dadurch sehr unregelmäßig gestaltete Körper entstehen.

In sehr alten Zellen dagegen erscheinen die Chromocentren dementsprechend vollkommen rund, wie es bei Anwendung von Feulgenfärbung schon sofort nach dem Verschwinden des Nucleolus der Fall ist. Während die Chromocentren unmittelbar nach dem Verschwinden des Nucleolus ihre ursprüngliche Lage beibehalten (Abb. 5a), sind sie in sehr alten Kernen, die extrem in die Länge gezogen sind, unregelmäßig verteilt oder in einer Reihe angeordnet (Abb. 5b). Gleichzeitig kann in alten Zellen vielfach ein fortschreitender Zerfall der Chromocentren in kleine Teilstücke (Chromatinkörper) festgestellt werden, wie aus Tabelle 1 hervorgeht.

Tabelle 1.

Zelle Nr.	Durchschnittliche Zahl der Chromatinkörper je Zelle
30—34	3,2
35—39	3,8
40—44	4,5

Neben den haploiden Protonemen wurden auch Regenerationsprotonemen aus Sporogonen, also diploide, untersucht. Im Prinzip verhielt sich der Nucleolus bei diesen genau so. Erwartungsgemäß war aber sowohl die Zahl der dunkel gefärbten Stellen auf der Nucleolusoberfläche

als auch die der zuletzt entstehenden Bruchstücke erhöht. Es wurden im Durchschnitt zwischen 5 und 9 gezählt (Abb. 6). Es besteht demnach ein klarer Zusammenhang zwischen der Zahl der Chromosomensätze und derjenigen der „aufgelagerten Körper" bzw. den später übrig bleibenden „Bruchstücken". Der Charakter dieser Körper als heterochromatischer Chromosomenteile ist also kaum zu bezweifeln, obwohl die Schwierigkeit besteht, daß in den Spitzenzellen der Caulonemen dieses Heterochromatin zunächst nicht erkannt werden kann.

Während der Nucleolus und die ihm aufgelagerten Chromocentren diese Entwicklung zeigen, verändert der Kern vor allem seine äußere Form. Der zuerst runde Kern wird manches Mal schon von der 2. Zelle an leicht elliptisch und später spindelförmig. In sehr alten Zellen ist er außerordentlich langgestreckt. Die Kernmembran ist in der Spitzenzelle in gefärbtem und ungefärbtem Zustand meist nicht sichtbar, wird in den darauffolgenden Zellen sehr deutlich, um später wieder schwerer erkennbar zu werden. In den Ruhekernen der Spitzenzelle findet sich bei keiner der angewandten Methoden irgendeine Struktur, während eine solche in den späteren Zellen immer vorhanden ist.

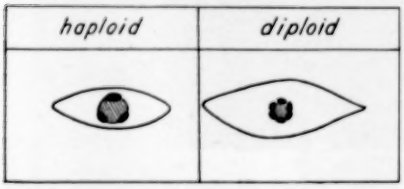


Abb. 6. Kern einer haploiden und einer diploiden Zelle mit dem Nucleolus aufgelagerten Chromocentren. Vergr. 800:1.

b) Kernvergrößerungen und Membranbräunung. Gleichzeitig mit diesen Veränderungen von Kern und Nucleolus sind auch in den Zellen charakteristische Entwicklungsstufen zu beobachten. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß das Plasmawachstum auf die erste Zelle beschränkt ist, in der auch der Nucleolus entsprechende Ausgestaltung zeigt. Genau so ist das Längenwachstum auf die Spitzenzelle beschränkt. Im Faden weiter zurückliegende Zellen strecken sich nicht mehr, während eine Zellverbreiterung, d. h. Volumzunahme der Zellen, fortschreitend etwa bis zur 15. Zelle gemessen wurde. Die Zellen erreichen dadurch etwa das doppelte Volumen des Ausgangswertes.

Besonders auffallend im Laufe der Zelldifferenzierung tritt die Wandbräunung hervor. Diese erstreckt sich, bis sie ihre endgültige Intensität erreicht hat, über mehrere Zellen. Sie ist aber immer schon deutlich in ihren ersten Anfängen von den vollständig farblosen Zellwänden zu unterscheiden. Gleichzeitig mit der ersten Wandbräunung ist auch eine auffallende Kernvergrößerung festzustellen.

Um diese Veränderungen zahlenmäßig festzuhalten, wurde jeweils die Zelle herangezogen, in der der Kern zum ersten Mal eine Länge von 35 μ besitzt. Meist erfolgt eine Verlängerung des Kerns von etwa 25 auf 35 μ, während die Breite etwa

konstant bleibt, so daß durch diese Zahlen seine Vergrößerung gut zu erfassen ist. In Abb. 7 ist die Korrelation zwischen den beiden Größen (Abszisse erste Zelle mit braungefärbter Wand, Ordinate erste Zelle mit Kernlänge über 35 μ) eingetragen. Die Ellipse gibt die Streuung der Wertepaare (IHM 1954). Die Werte stammen aus 50 Caulonemen. Die durch die Ellipse gegebene Darstellung zeigt eine sehr gut gesicherte Korrelation. Die Regressionsgrade, die durch den eingezeichneten konjugierten Durchmesser der Ellipse erhalten wird, beweist deutlich den Zusammen-

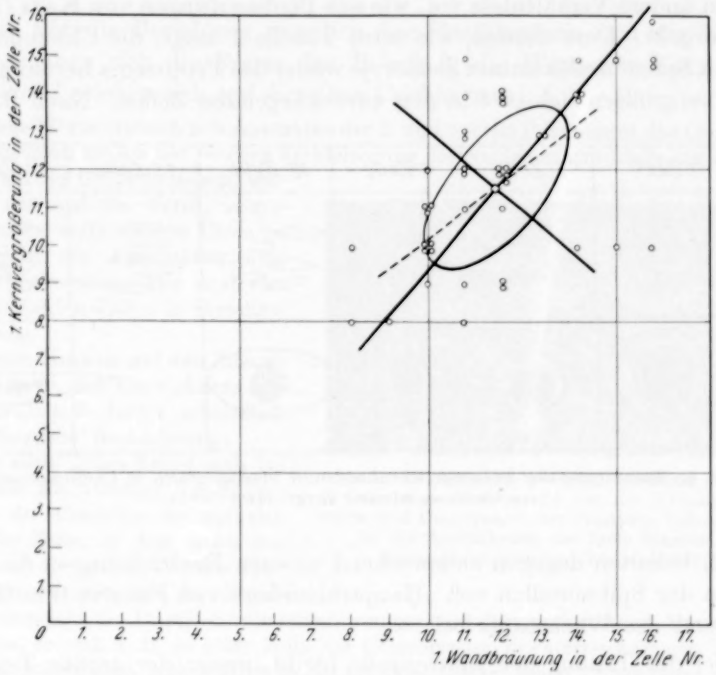


Abb. 7. Zusammenhang zwischen Kernvergrößerung und Membranbräunung in den Caulonemen (s. Text).

hang, der zwischen beiden Größen besteht. In beiden Fällen liegen alle Werte zwischen der 8. und der 16. Zelle. Dieselben Ergebnisse wurden auch in anderen Meßserien erhalten.

Auf eine gleichförmige Entwicklung in Zelle, Kern und Nucleolus weist auch ein Vergleich des ersten sichtbaren Auftretens der Chromocentren, das sich als Lappung des Nucleolus zu erkennen gibt, mit der Kernvergrößerung hin. Hieraus erhaltene Kurven zeigen einen deutlichen Parallelverlauf mit den Membranbräunungskurven, wobei aber die Kurve für die „Nucleoluslappung" um 2 Zellen gegen die Spitze des Fadens verschoben ist.

c) Kernform und Plastidenform. WOESSLER hat schon 1933 auf eine weitere auffallende Parallelität bei der Entwicklung der Moosprotonemen hingewiesen. Sie schreibt: „Die Form der Chromatophoren entspricht

in der Regel der des Kernes derselben Zelle". Eine solche Übereinstimmung läßt sich auch bei *Funaria* für die durch die äußeren Umrisse gegebene Form konstatieren. Während wir in der Spitzenzelle der Caulonemen große, stärkehaltige, kugelige Plastiden vorfinden, sind diese in den darauf folgenden Zellen wesentlich kleiner, zunächst aber immer noch kugelig (Abb. 8). In den Protonemazellen von *Mnium hornum* liegen andere Verhältnisse vor, wie aus Beobachtungen von KAJA (1954) hervorgeht. Dort werden, wie seine Tabelle 1 zeigt, die Chloroplasten in den Spitzenzellen immer kleiner, je weiter das Protonema heranwächst, und vergrößern sich erst in den zurückliegenden Zellen. Nach BAUER

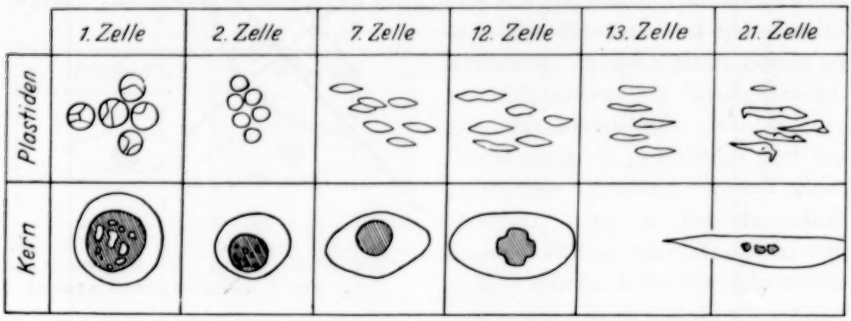


Abb. 8. Zusammenhang zwischen Kernform und Plastidenform in Caulonemazellen verschiedenen Alters. Vergr. etwa 900:1.

(1942) behalten dagegen entsprechend unseren Beobachtungen die Plastiden der Spitzenzellen von „Hauptrhizoiden" von *Funaria* ihre Größe während des Wachstums bei[1].

Bei der Teilung der Spitzenzelle bleibt immer der größte Teil der Plastiden in dieser. Die nach hinten abgetrennte zweite Zelle enthält sehr viel weniger und kleinere Plastiden. Die Form der zunächst kugeligen Plastiden ändert sich dann weiter über elliptisch zu spindelförmig, bis sie schließlich nur noch als schmale strichförmige Bildungen erscheinen. Nahezu strichförmige Chloroplasten finden sich auch in bestimmten Teilen der Blätter von *Catharinea* und *Polytrichum*, die dann genau wie in den Caulonemen immer in der Längsrichtung der Zelle angeordnet sind (EYMÉ 1954, DANGEARD 1925). Diese langgezogenen Plastiden können unter Umständen sehr unregelmäßige Umrisse aufweisen (Abb. 8). KAJA (1954) nimmt an, daß solche Formen auf einer amöboiden Beweglichkeit beruhen, die Chloroplasten von größerem Durchmesser besitzen

[1] BAUER beobachtet an Protonema von *Funaria* nie ein Auftreten von „Rhizoiden" vor den Knospen. Dies beruht darauf, daß er als wesentliches Merkmal für „Rhizoide" ihren positiven Geotropismus ansah. Einen solchen besitzen die Caulonemen nicht!

Tabelle 2.

Form	Groß kugelig	Klein kugelig	Oval	Spindelförmig	Strichförmig
der Plastiden in den Zellen Nr. . .	1	2—6	7—8	9—17	18—∞
des Kerns in den Zellen Nr. . . .	1	2—3	4—13	14—∞	

sollen. Für die Beziehung zwischen der Plastidenform und der Kernform ergeben sich die Werte der Tabelle 2 (die Werte für Kern und Plastiden beziehen sich auf dieselben Caulonemen).

Diese Werte, die sich mit Ausnahme der 2. und 3. Zelle (hier nimmt das Gesamt-Kernvolumen infolge der raschen Verkleinerung des Nucleolus gleichfalls etwas ab) nicht auf die Größe beziehen, sondern nur auf die Form, zeigen zwar keine vollkommene Übereinstimmung, die Parallelität wird aber ohne weiteres klar und verläuft in beiden Fällen in derselben Richtung.

Abb. 9. Beginnende Seitenfadenbildung in der 3. Zelle eines Caulonemas vor der Kernteilung. Kern und Hauptmasse der Plastiden haben sich in die Ausstülpung der Zelle begeben. Lebendbeobachtung. Vergr. 800:1.

Einen Hinweis auf den Zusammenhang in der Entwicklung der Zellbestandteile bietet schließlich noch folgende Beobachtung:

In allen Zellen findet sich bei normaler Entwicklung die Hauptmasse der Plastiden im apikalen Teil der Zelle, in dem auch der Kern und der größte Teil des Plasmas konzentriert ist. In diesem Teil entspricht die Plastidenform einem weniger weit fortgeschrittenen Alterungsstadium, so daß z. B. in einer Zelle die Chloroplasten des spitzenwärtigen Teiles noch elliptisch sind, während sie in der hinteren Region schon Spindelform angenommen haben.

d) Bildung von Seitenfäden. Besonderen Aufschluß über die Entwicklung der Kernverhältnisse gibt uns die Bildung von Seitenfäden an den Caulonemen. Diese sind in gewisser Weise caulonemaähnlich, meist chloroplastenreicher als die Caulonemen selbst und ohne braune Zellwände, lassen sich aber deutlich von den Zellen des Chloronemas unterscheiden (Sironval 1947). Die Teilung, die zu einem Seitenfaden führt, erfolgt durchschnittlich in der 3. bis 4. Zelle, und zwar immer in deren apikalem Teil, wobei sich sowohl das Plasma als auch die Plastiden um den Kern häufen (Abb. 9) (vgl. Czurda 1930). Die Plastiden ändern dabei ihre Form bereits vor der Teilung, wenn sie in die Region des sich teilenden Zellkernes wandern, während die liegenbleibenden Chloroplasten ihre Gestalt beibehalten (Czurda 1930). In den neuentstandenen Schwesterzellen liegt nach der Teilung ein verschiedener Plasmazustand vor, der sich besonders deutlich in der Verschiedenheit von Kern und

Plastiden in den beiden Zellen manifestiert (z. B. Abb. 4 bei WOESSLER 1933). Die Zelle des Hauptfadens behält ihren Charakter bei, ihr Kern fügt sich ohne Veränderung in die Entwicklungsreihe der übrigen Kerne ein, während die Zelle des Seitenfadens zu eines Spitzenzelle wird und ihr Kern erneut die Eigenschaften des Kernes einer solchen annimmt. Die Seitenfadenbildung ist damit deutlich als eine inaequale Zellteilung gekennzeichnet.

Tabelle 3. *Durchmesser des Nucleolus in μ.*

Lfd. Nr. der Zelle	In der Zelle des Hauptfadens	In der ältesten Zelle des Seitenfadens	In der jüngsten Zelle des Seitenfadens
1	12,8	—	—
2	7,8	—	—
3	7,3	—	—
4	6,5	5,1[1]	—
5	6,5	8,0[1]	—
6	6,9	9,9[1]	—
7	6,5	6,5	11,2
8	6,7	6,5	9,6
9	6,4	6,4	9,8
10	6,9	6,7	8,4
11	6,7	6,5	9,6
12	6,7	5,4	9,8
13	6,5	5,6	9,6
14	6,4	5,3	9,4

[1] Seitenfaden besteht nur aus einer Zelle.

Zur Verdeutlichung dieser Vorgänge sollen hier die Größenverhältnisse der Nucleolen kurz erörtert werden:

Als Beispiel sind in Tabelle 3 die aus einem Caulonema erhaltenen Werte eingetragen. Bei anderen Caulonemen liegen genau dieselben Verhältnisse vor.

Während unmittelbar nach der Teilung die Nucleolen des Haupt- und Seitenfadens noch ungefähr gleich groß sind, wächst der Nucleolus im Seitenfaden allmählich heran. Durch dieses Heranwachsen, das mit einer sichtbaren Vergrößerung der „Vacuolen" im Nucleolus verbunden ist, übernimmt der Kern wieder die Funktionen eines Spitzenzellkerns. Allerdings ereicht der Nucleolus niemals das Volumen eines solchen in der Apikalzelle des Hauptfadens. Nach der Teilung der Spitzenzelle sind in den Seitenfäden dieselben Vorgänge festzustellen wie im Hauptfaden, es erfolgt wieder eine rasche Abnahme des Nucleolarvolumens, Verschwinden der „Vacuolen", und schließlich erscheinen Chromocentren auf der Oberfläche des Nucleolus.

e) Kernform nach intercalaren Teilungen. Werden kürzere oder längere Teile von Caulonemafäden isoliert, so teilen sich deren Zellen intercalar. Die ersten Teilungen erfolgen zwischen 18 und 20 Std nach der Isolierung und führen zu ungefähr gleich großen Tochterzellen (Abb. 10a u. b), ohne daß dabei die ursprüngliche Mutterzelle ein Wachstum erfährt. Die beiden Tochterzellen nehmen also nun den Raum der Ausgangszelle ein, und jede neue Zelle besitzt die halbe Länge einer gewöhnlichen Caulonemazelle. Gleichzeitig mit dieser Zellteilung tritt eine starke Chloroplastenvermehrung ein, so daß die geteilten Zellen wesentlich chlorophyllreicher sind als gewöhnliche Caulonemazellen. Die beiden Faktoren, Zellverkürzung und Chloroplastenvermehrung, führen zu der Annahme, daß es sich um eine Wiederherstellung des Chloronemastadiums *innerhalb* des Caulonemas handelt (BOPP 1954a). Ein Weiterwachsen solcherart geteilter Zellen wurde in keinem Falle beobachtet.

In den in der geschilderten Weise neuentstandenen Zellen besitzen die Kerne schon kurz nach der Teilung wieder die Form, die dem Zellalter innerhalb des Caulonemafadens vor der Teilung entspricht. Die Tochterzellen verhalten sich gleich, eine verschiedene Entwicklung der beiden Zellen, wie das bei allen übrigen nicht in der Apikalzelle verlaufenden Teilungen der Protonemen der Fall ist, z. B. bei der vorher besprochenen Seitenfadenbildung, tritt nicht auf. Die Teilung ist in diesem Falle vollkommen aequal, was sowohl in der äußeren Gestalt und Größe der Kerne als auch in der Ausbildung von Nucleolus und Chromocentren seinen Ausdruck findet. Der Nucleolus ist immer kompakt, ohne Vacuolen, und klein. Die Chromocentren sind in gleicher Zahl vorhanden wie vor der Teilung und treten in den Ruhekernen sofort wieder auf. Ebenso entspricht ihre Lage und ihre Größe derjenigen der Zelle vor der Teilung. Im allgemeinen läßt sich am Kern daher eine Veränderung durch die Teilung nicht konstatieren, außer daß mitunter in den neuen Kernen 2 Nucleolen auftreten, was sonst nie beobachtet wurde.

a b

Abb. 10a u. b. a Schiefe Zellwand zwischen zwei ursprünglichen Caulonemazellen. In der einen Zelle, die sich sekundär geteilt hat, sind die Chloroplasten deutlich vermehrt. b Senkrechte Zellwand zwischen zwei nach Isolierung intercalar geteilten Zellen. Die Chloroplasten sind in beiden Zellen gleich zahlreich. Vergr. 560:1.

In allen Versuchen erfolgten die Teilungen höchstens bis zur 18. Zelle, also in Zellen, in denen der Nucleolus mit Sicherheit noch erhalten ist. Wahrscheinlich haben Zellen, in denen der Nucleolus verschwunden ist, ihre Teilungsfähigkeit infolge der weitgehenden Differenzierung verloren, so daß sie nicht mehr zur Teilung angeregt werden können (Bopp 1954a).

f) Kerne im Chloronema. Nach der ausführlichen Betrachtung der Verhältnisse in den Caulonemen bieten die Chloronemen kaum wesentlich Neues. Die Kerne verhalten sich hier und in den Pflänzchen nach eigenen Beobachtungen und den Angaben anderer Autoren im wesentlichen genau so wie für Caulonema beschrieben (z. B. Schaede, Woessler, Dening, Oberheidt). Im einzelnen ergibt sich folgendes: In der Spitzenzelle ist der Kern schwach gefärbt, der Nucleolus ist sehr groß und färbt sich mit Carmin dunkel an. In den älteren Teilen der Fäden erscheinen die Kerne oval bis spindelförmig, den Nucleolen sind Chromocentren aufgelagert. In sehr vereinzelten Fällen waren auch im Chloronema die Nucleolen verschwunden und die Chromocentren isoliert vorhanden. Allerdings behielten die Chromocentren in den untersuchten Zellen immer ihre ursprüngliche Lage bei, so daß es sich nicht immer einwandfrei feststellen läßt, ob der Nucleolus tatsächlich verschwunden ist oder nur von den relativ großen Chromocentren vollkommen verdeckt wird. Häufig

erschwert auch der Chloroplastenreichtum in diesen Zellen eine einwandfreie Beobachtung der Kerne. Dieselben Verhältnisse wie für haploide wurden auch für diploide Protonemen gefunden.

Das von STRAUB (1948) für das Protonema von *Funaria hygrometrica* experimentell nachgewiesene konstante Verhältnis von Kern- und Zellvolumen gilt ganz allgemein (SCHRATZ 1927). Es kann auch ohne besondere Messung daher gesagt werden, daß eine so auffallende Kernvergrößerung, wie sie in den Caulonemen auftritt, im Chloronema nicht vorkommt.

Während des normalen Wachstums teilen sich auch die Chloronemata nur in den Spitzenzellen; eine Ausnahme bildet die Entstehung von Trennzellen (Tmemen), die schon mehrfach für verschiedene Moose geschildert wurde (CORRENS 1899, BAUER 1942). Sie führt zu Zellen verschiedenen Charakters, ist also (wie schon die Seitenfadenbildung) eine inaequale Teilung, die in alten Teilen des Chloronemas stattfindet. Eine Tochterzelle enthält alle Chloroplasten, ist sehr viel größer, und der Kern besitzt ebenfalls schon kurz nach der Teilung etwa das 10fache Volumen des Kernes der anderen Zelle, die vollständig chloroplastenfrei bleibt. Ähnlich wie der Kern differiert auch die Nucleolusgröße in den beiden Tochterzellen, von denen die chloroplastenhaltige als Fortpflanzungskörper anzusehen ist (CORRENS).

Die Bildung von Knospen, die bei *Funaria* an den Seitenfäden von Caulonemen angelegt werden (SIRONVAL 1947, BOPP 1952), ist nicht durch besondere karyologische Veränderungen gekennzeichnet. Die Kern- und Nucleolusverhältnisse sind dieselben, wie sie bereits für die Seitenfadenbildung beschrieben wurden. Die Protonemaspitzenzelle mit ihrem großen Nucleolus setzt sich in der Scheitelzelle des Moospflänzchens fort, die sich ebenfalls durch einen wesentlich größeren Nucleolus von allen Nachbarzellen charakteristisch unterscheidet (Abb. bei HÖFER 1932). Auch hinsichtlich der Chromocentren liegen dieselben Verhältnisse wie im Protonema vor (SCHAEDE 1936).

Diskussion.

a) Die äußere Form des Zellkerns und der Plastiden. Die zunächst am meisten ins Auge fallende Veränderung im Laufe der Entwicklung der Caulonemen ist der äußere Gestaltswechsel des Kernes, der seine Wiederholung wenigstens in groben Zügen in der Veränderung der äußeren Umrisse der Chloroplasten findet. Ohne weiteres erklärt sich der runde Zellkern der plasmareichen Spitzenzelle, die keine Vacuole besitzt. Er kann in dem ihn allseitig umgebenden, gleichen Medium allein auf Grund der Oberflächenspannung seines flüssigen Inhalts die Kugelform annehmen. Entsprechend kann auch die ovale Form in den folgenden Zellen allein dadurch bedingt sein, daß der Plasmaschlauch der hier von einer großen Vacuole erfüllten Zelle die Kerne an die Wand drückt,

eine Tatsache, die durch die Lage dieser Kerne an der Außenmembran zum Ausdruck kommt (vgl. KÜSTER 1951, S. 161). Unter Umständen könnte auch die weiterhin auftretende spindelförmige Gestalt allein auf die Verteilungsverhältnisse des Plasmas zurückgeführt werden, denn es ist vielfach zu dünnen Strängen ausgezogen und kann dadurch die ebenfalls sehr starke Verlängerung der Kerne bewirken, so daß diese mit ihren Enden, die oft nicht deutlich zu erkennen sind, außerordentlich dünn zugespitzt erscheinen. In allen Fällen würde es sich also um eine rein passive Entstehung der Kernform allein auf Grund der Plasmaverteilung in der Zelle handeln. Daß aber auch andere Faktoren für die Form des Zellkerns verantwortlich sein können, zeigen besonders anschaulich die Untersuchungen WEBERs (1925, 1927) an Schließzellen. Er stellte für *Vicia faba* fest, daß bei geöffneter Spalte die Viscosität der Plasmagrenzschicht erhöht und der Kern der Zelle rund ist, während bei geschlossener Spalte die Viscosität erniedrigt ist und der Kern spindelförmig erscheint. Zwar ergaben sich für *Tradescantia virginiana* (WEBER 1926) andere Verhältnisse, doch geht aus den Versuchen auf alle Fälle hervor, daß nicht allein die Verteilung des Cytoplasmas, sondern vor allem auch physikalisch-chemische Faktoren, wie z. B. die Viscosität des Plasmas oder der Stärkegehalt der Zelle, für die Form des Kerns verantwortlich sein können. Weiterhin können Faktoren, die den Plasmazustand beeinflussen, auch direkt die Kernmembran verändern (BANCHER 1938), was selbstverständlich ebenfalls von Einfluß auf die äußere Kerngestalt sein kann. Wie die Kernmembran läßt sich auch die Membran von Chloroplasten experimentell verändern und zu langen dünnen Fäden ausziehen (DANGEARD 1941). Gerade die Parallelität der Erscheinungsformen von Kern und Plastiden spricht daher wohl eher dafür, daß die Veränderung physikalisch-chemischer Faktoren im Laufe der Zellentwicklung für den Gestaltswechsel verantwortlich ist, zumal so verschieden große Körper kaum in so weitgehend gleicher Weise durch die Plasmaverteilung beeinflußt werden können. Eine Entwicklung der Plastiden nicht nur bis zur Spindelform, sondern bis zu schmalen, unregelmäßigen strichförmigen Gebilden ist ebenso nur durch eine Veränderung des physikalisch-chemischen Zustandes von Plastidenmembran und Plasma möglich. Die Verteilungsverhältnisse des Plasmas allein geben dafür keinen zwingenden Grund ab.

Schließlich findet der Einfluß des verschiedenen Plasmazustandes auf Kern- und Plastidenform einen beredten Ausdruck in der zur Seitenfadenbildung führenden Teilung, bei der schon unmittelbar nach dem Auftreten der Teilungswand nicht nur die Plastidenform sondern auch die Kernform in den Tochterzellen deutlich differiert. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Einflußnahme des Kerns auf das Zellgeschehen allein aus der Kernform nicht erschlossen werden kann.

b) Zusammenhang zwischen Kerngröße und Zelldifferenzierung. Anders liegen die Verhältnisse dagegen bei Berücksichtigung der Größenverhältnisse der Kerne. Die Kernvergrößerung in den Caulonemen geht über die sonst so enge Beziehung zwischen Kern- und Zellgröße (STRAUB 1948) deutlich hinaus. Während sich das Volumen der Zelle etwa verdoppelt, erreichen die Kerne dieser Zellen mindestens das Vierfache ihrer Ausgangsgröße, wobei hervorgehoben werden muß, daß eine besonders deutliche Vergrößerung sehr rasch, nämlich von einer zur nächsten Zelle, vonstatten geht.

Der Zusammenhang von derartigen plötzlichen Kernvergrößerungen mit endomitotischen Vorgängen ist allgemein bekannt. Es liegt daher zunächst nahe, auch bei der auffallenden Kernvergrößerung in den Caulonemen von *Funaria* an eine Vergrößerung durch endomitotische Polyploidisierung zu denken. Nun haben aber SCHRADER u. LEUCHTENBERGER (1950) bei einem Insekt (*Arvelius albopunctatus*) gezeigt, daß eine rhythmische Vervielfältigung des Kernvolumens durchaus auch ohne Vermehrung des chromatischen Materials, allein durch eine Zunahme der außerchromosomalen Eiweiße, zustande kommen kann. Andererseits sollen gerade bei phylogenetisch älteren Pflanzen (z. B. Magnolien und Gymnospermen), wie DEUFEL nachwies (1954), Kernvergrößerungen in Drüsenzellen ebenfalls lediglich auf Karyolymphevermehrung beruhen im Gegensatz zu anderen Pflanzen, bei denen in Drüsenzellen Volumzunahme als Folge von Endomitose auftritt. Auch Drüsen, die bestimmte Stoffe wie Schleim und Zucker sezernieren, besitzen nach DEUFEL nicht endomitotisch vergrößerte Zellkerne. Ein Vergleich mit der Kernvergrößerung bei Drüsenzellen liegt hier nun insofern nahe, als in den Zellen, in denen sich die Wand bräunt, entweder zeitweilig eine erhöhte Stoffproduktion oder wenigstens ein wesentlich verändertes Stoffwechselgeschehen, das zur Membranbräunung führt, stattfindet. Bei dem klar herausgestellten zeitlichen Zusammenhang von Kernvergrößerung und Bräunung der Zellwand ist es also durchaus möglich, daß eine kausale Beziehung zwischen beiden vorliegt. Eine einwandfreie Möglichkeit der Prüfung, in welcher Weise die Kernvergrößerung in unserem Falle vor sich geht, war zwar nicht gegeben, die aufgeführten Tatsachen, die eine Kernvergrößerung auch durch Karyolymphzunahme oder Eiweißvermehrung zeigen, machen es aber sehr unwahrscheinlich, daß bei *Funaria* Polyploidisierung, die bis jetzt nur bei Blütenpflanzen nachgewiesen ist, vorkommt.

c) Der Charakter der Chromocentren. Der Eindruck, daß es sich um eine Polyploidisierung durch Endomitose in den Arbeitskernen der Caulonemen handelt, wird weiterhin auch noch durch die Vergrößerung der Chromocentren erweckt. Aber auch hier handelt es sich, wie im folgenden gezeigt wird, offenbar um andere Vorgänge. Es wurde bereits

dargelegt, daß es sich bei den dem Nucleolus aufgelagerten Körpern tatsächlich um Chromocentren handeln muß. Ihre Ähnlichkeit mit den von KOLLER (1951) als „nucleolar sizer" bezeichneten Körpern und mit den Bildern bei vielen anderen Autoren, namentlich auch für Moose (MILOVIDO, JACHIMSKY) ist so auffallend, daß eine Gleichheit angenommen werden darf. Allerdings besteht die Schwierigkeit für eine Deutung als Chromocentren, weil sie nicht unmittelbar nach der Teilung sichtbar sind. SCHAEDE (1936) glaubt, daß dies bei *Fontinalis* vielleicht darauf zurückgeführt werden könnte, daß in den Zellen Stoffe vorkommen, die die Nuclealreaktion nach Feulgen ungünstig beeinflussen, denn auch dort ist in den „Scheitelzellen und ihren ersten Teilungsprodukten" dasselbe Phänomen zu beobachten. Unter Umständen könnte die hydrolysierende Wirkung des Alkohol-Eisessiggemisches einen gewissen Einfluß auf die sichtbare Größe der Chromocentren bei Feulgenfärbung haben, die sich natürlich besonders stark in den jüngsten Zellen mit ihren leicht durchlässigen Membranen auswirkt. Das scheint aber sehr wenig wahrscheinlich, da ja sowohl bei Carminfärbung als auch bei Lebendbeobachtung die Nucleolen in den ersten Zellen vollkommen rund und ohne besondere färbbare Auflagerungen erscheinen, wie es zu erwarten wäre, wenn die Chromocentren von Anfang an vorhanden wären. In beiden Fällen lassen sie sich erst in den rückwärtigen Zellen konstatieren, so daß es sich wohl nicht um Artefakte, sondern um tatsächlich vorhandene Änderungen der Struktur handelt.

Da die Körper später wesentlich vergrößert erscheinen, was besonders die Nuclealreaktion gut zeigt, bei der sie etwa in der 5. Zelle zum ersten Mal sichtbar werden, kann angenommen werden, daß sie vorher vielleicht nur wegen ihrer Kleinheit nicht erkannt werden können oder aber daß sie erst nach weiteren Kernteilungen, die zur Bildung von Seitenfäden führen, auftreten. Das würde mit Beobachtungen STICHS (1954) übereinstimmen, der ebenfalls erst nach der 5. Furchungsteilung in den Eiern von *Cyclops* in den Interphasekernen Heterochromatin beobachtete, während die früheren Interphasekerne immer eine gleichmäßige Färbung bei der Feulgenreaktion zeigten. Vermehrung der chromatischen Substanz der Ruhekerne und Vergrößerung der Chromocentren, häufig mit einer Verkleinerung oder einem völligen Verschwinden des Nucleolus verbunden, wurde vielfach bei der Reizung der Drüsenzellen von Insektivoren beobachtet (Literatur bei TISCHLER, S. 133 und 210). Allerdings handelt es sich dort immer nur um Veränderungen, die, wie die Kernvergrößerung, lediglich während der Drüsentätigkeit bzw. Reizung anhalten oder mehrfach rhythmisch auftreten (vgl. ALTMANN 1952), während sowohl die Kern- als auch die Chromocentrenvergrößerung in den Caulonemen beibehalten werden.

Demnach ist bei verspätetem Auftreten der Chromocentren und ihrer Vergrößerung genauso wie bei der Volumzunahme des Kernes die Möglichkeit

gegeben, daß es sich um eine Strukturänderung handelt, die mit der Tätigkeit des Kernes im Zellgeschehen im Zusammenhang steht. Die Annahme einer Polyploidisierung kann wohl ausgeschaltet werden, zumal da bei diploiden Zellen verschiedenen Gewebes sehr wohl ein unterschiedlicher DNS-Gehalt auftreten kann (SCHRADER und LEUCHTENBERGER 1949).

Auf Grund der vorliegenden Beobachtungen kann jedoch nicht ausgesagt werden, in welcher Weise ein Zusammenhang zwischen bestimmten Chromosomenteilen und diesem immer ausschließlich dem Nucleolus anliegenden Heterochromatin besteht, so etwa mit dem von VAARAMA (1949, 1950) für verschiedene Moosarten beschriebenen accessorischen Chromosomen, wobei noch hinzukommt, daß VAARAMA (1953) bei den von ihm untersuchten *Funaria*rassen keine accessorischen Chromosomen fand.

Es ist schließlich noch darauf hinzuweisen, daß die in den Caulonemen festgestellten Veränderungen von Plastiden, Kern und Nucleolus vielfach als Alterserscheinungen betrachtet werden, die schließlich zur völligen Degeneration führen. In dem in dieser Arbeit betrachteten Caulonemaabschnitt sind die Zellen und ihre Kerne aber immer noch lebend, und die Veränderungen führen zu einer Umgestaltung, die die Caulonemen für eine bestimmte Funktion, wahrscheinlich die Stoff- und Wasserleitung, befähigt (vgl. hierzu SCHÖNE 1906).

Zusammenfassung.

1. Die Entwicklung von Zelle und Kern in den Caulonemen von *Funaria hygrometrica* Sibth. wurde untersucht.

2. Ein Zusammenhang zwischen bestimmten Funktionen der Zelle und dem Kernzustand in verschiedenen Abschnitten konnte festgestellt werden. So besitzen die Spitzenzellen, auf die das Plasmawachstum beschränkt ist, einen großen, stark „vacuolisierten" Nucleolus. Die Zellen, in denen sich die Membran bräunt, zeigen eine meßbare Kernvergrößerung.

3. Chromocentren werden erst in älteren Zellen des Zellfadens beobachtet, sie liegen immer dem Nucleolus außen an. In alten Zellen verschwindet der Nucleolus, infolgedessen bleiben die Chromocentren als größere Chromatinbrocken allein erhalten.

4. Zwischen der äußeren Form des Kernes und der Plastiden in den einzelnen Zellen besteht eine weitgehende Übereinstimmung, diese ändert sich sehr regelmäßig von rundem über ovalen zu spindelförmigem Umriß.

5. Die Bildung von Tmemen (Trennzellen) und von Seitenfäden werden als inaequale Zellteilungen beschrieben.

6. Intercalare Zellteilungen, die durch Isolierung hervorgerufen werden, führen zu gleichwertigen Tochterzellen. Es ist der einzige Fall,

bei dem in zurückliegenden Zellen des Protonemas von *Funaria hygrometrica* aequale Zellteilungen vorkommen.

7. Die Knospenbildung ist nicht durch besondere karyologische Vorgänge gekennzeichnet. Die mit großem Nucleolus versehene Spitzenzelle des Protonemas setzt sich kontinuierlich in der Scheitelzelle der Moospflänzchen fort.

Literatur.

ALTMANN, H. W.: Über die Abgabe von Kernstoffen in das Protoplasma der menschlichen Leberzelle. Z. Naturforsch. 4b, 138—144 (1949). — Über den Funktionsformwechsel des Kerns im exokrinen Gewebe des Pankreas. Z. Krebsforsch. **58**, 632—645 (1952). — BANCHER, E.: Mikrochirurgische Kernstudien. Protoplasma (Berl.) **31**, 301—310 (1938). — BAUER, L.: Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. Flora (Jena) **36**, 30—84 (1942). — BOPP, M.: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Laubmoosprotonemen. Z. Bot. **40**, 119—152 (1952). — Ein Beitrag zur Differenzierung im Moosprotonema. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 177—184 (1954a). — Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Kern- und Zelldifferenzierung in den Rhizoiden von *Funaria hygrometrica*. 8. Internat. Bot. Congr. Sect. 16, S. 80—81, 1954b. — CORRENS, C.: Untersuchungen über die Vermehrung der Laubmoose durch Brutorgane und Stecklinge. Jena 1899. — CZURDA, V.: Ein Objekt für die Dauerbeobachtung der Vorgänge in der lebenden grünen Pflanzenzelle. Protoplasma (Berl.) **10**, 356—361 (1930). — DANGEARD, P.: Observations cytologiques sur les poils foliaires, à forme de paraphyses, des Polytrices. Bull. Soc. Bot. **72**, 125 (1925). — Sur quelques modifications, pathologiques des plastes et sur la mise en évidence d'une membrane plastidaire. C. r. Acad. Sci. Paris **213**, 884—887 (1941). — DENING, K.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Gametophyten von *Buxbaumia aphylla* (L). Verh. Nat. Ver. Preuß. Rheinl. Westf. **85**, 305—345 (1929). — DEUFEL, I.: Zytologische Untersuchungen an sezernierenden Zellen. Naturwiss. **41**, 41—42 (1954). — EYMÉ, I.: Recherches cytologiques sur les mousses. Botaniste **38**, 1—166 (1954). — GEITLER, L. Die Entstehung der polyploiden somatischen Zellkerne bei Heteropteren durch wiederholte Chromosomenteilung ohne Spindelbildung und Kernteilung. Naturwiss. **26**, 722—723 (1938). — HEITZ, E.: Das Verhalten von Kern und Chloroplasten bei der Regeneration. Z. Zellforsch. **2**, 69—86 (1925). — Das Heterochromatin der Moose. Jb. wiss. Bot. **67**, 762—818 (1928). — Über intraindividuale Polyploidie. Schweiz. Ges. Vererbgsforsch. **28**, 260—271 (1953). — HÖFER, K.: Beiträge zur Karyologie der Moose. Jb. wiss. Bot. **69**, 687—761 (1928). — Karyologie. In Verdoorns Manual of Bryology, S. 159—206, 1932. — HUSKINS, C. L., and M. STEINITZ: The nucleus in differentiation and development I. Heterochromatic bodies in energic nuclei of Rhoeo roots. J. Hered. **39**, 35—43 (1948). — IHM, P.: Ein Konfidenzbereich für den Erwartungswert eines Mittelwertpaares. Z. Vererbungslehre **86**, 54—60 (1954). — KAJA, H.: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Plastiden der Moose. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 93—106 (1954). — KOLLER, P. C.: The experimental modification of nucleic acid systems in the cell. Symposia Soc. Exper. Biol. **1951**, 270—290. — KÜSTER, E.: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. Jena 1951. — LACOUR, L. F.: Heterochromatin and the organisation of nucleoli in plants. Heredity (Lond.) **5**, 37—50 (1951). — LINSBAUER, K.: Kerne, Nukleolen und Plasmabewegung in den Blasenzellen von Mesembryanthemum cristallinum. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. Abt. 1, **141**, 1—30 (1932). — MILOVIDOV, P. F.: Zur Anuklealität des pflanzlichen Nukleolus. Planta (Berl.) **31**, 60—72 (1940). — OBERHEIDT, K.: Die Entwicklung der Protonemata und

die Anlage der Stämmchen bei einigen Laubmoosen. Diss. Marburg 1931. — RESCH, A.: Untersuchungen über Kerndifferenzierung in peripheren Zellschichten der Sproßachse einiger Blütenpflanzen. Chromosoma **5**, 296—316 (1952). — Beiträge zur Cytologie des Phloems. Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen bei *Vicia faba*. Planta (Berl.) **44**, 75—98 (1954). — SALMON, I.: Quelques aspects cytologiques du développement des tubes criblés. 8. Internat. Bot. Congr. Sect. 8, S. 280—281, 1954. — SCHAEDE, R.: Untersuchungen mit der Nuklealreaktion an Kern und Kernteilung. Planta **26**, 167—192 (1936). — SCHEUBER, L. M.: A cytological study of Timmia cucullata. Cellule **41**, 147—162 (1932). — SCHOENE, K.: Beiträge zur Kenntnis der Keimung der Laubmoossporen und zur Biologie der Laubmoosrhizoiden. Flora (Jena) **96**, 276—321 (1906). — SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in Avelius albopunctatus (de Geer). Exper. Cell Res. **1**, 421—452 (1950). — SCHRATZ, E.: Über die Korrelation zwischen Zellgröße und Chloroplastenmasse bei Moosen. Jb. wiss. Bot. **66**, 748—772 (1927). — SIRONVAL, C.: Expériences sur les stades de développement de la forme filamenteuse en culture de *Funaria hygrometrica L.* Bull. Soc. bot. Belg. **79**, 48—78 (1947). — STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von Cyclops strenuus. Ein Beitrag zur Mechanik der Mitose. Chromosoma **6**, 199—236 (1954). — STRAUB, J.: Zur Organisation der Zelle. Biol. Zbl. **67**, 479—489 (1948). — TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie, 1. Hälfte, Ruhekern, 2. Aufl. Berlin 1934. — TSCHERMAK-WOESS, R., u. G. HASITSCHKA: Über die endomitotische Polyploidisierung im Zuge der Differenzierung von Trichomen und Trichozyten bei Angiospermen. Österr. bot. Z. **101**, 39—117 (1954). — VAARAMA, A.: Meiosis in moss species of the family Grimmiaceae. Port. Acta biol. Goldschm.-Vol., 47—78 (1949). — Accessory isochromosomes in the moss species Dicranum majus. Nature (Lond.) **165**, 894 (1949). — Some chromosome numbers of californian and finnish moss species. Bryol. **56**, 169—177 (1953). — WEBER, F.: Plasmolyseform und Kernform funktionierender Schließzellen. Jb. wiss. Bot. **64**, 687—701 (1925). — Der Zellkern der Schließzellen. Planta (Berl.) **1**, 441—471 (1926). — Cytoplasma und Kernzustandsänderungen bei Schließzellen. Protoplasma (Berl.) **2**, 305—311 (1927). — WETTSTEIN, D. v.: Beeinflussung der Polarität und undifferenzierte Gewebebildung aus Moossporen. Z. Bot. **41**, 199—226 (1953). — WOESLER, A.: Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen an den Vorkeimen einiger Laubmoose sowie einige Beobachtungen über die Entwicklung ihrer Stämmchen. Beitr. Biol. Pflanz., **21**, 59—116 (1933). — WOLL, E.: Beiträge zum Differenzierungsproblem an Hand der Cytologie der Pflanzengalle. Z. Bot. **42**, 1—29 (1954a). — Untersuchungen über die cytologische Differenzierung einiger Pflanzengallen. Planta (Berl.) **43**, 477—495 (1954b).

Dr. MARTIN BOPP, Freiburg i. Br., Botanisches Institut der Universität.

Planta, Bd. 45, S. 591—595, (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Frankfurt a. M.

Kurze Mitteilung.

DIE SPEKTRALE TEMPERATURKURVE VON KARTOFFELPARENCHYM UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DAS LICHTATMUNGSPROBLEM.

Von

GÜNTER ROSENSTOCK.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 16. April 1955.)

Die Frage einer möglichen *direkten* Beeinflussung des Atmungssystemes durch Strahlung im Sinne einer „Lichtatmungsreaktion des Protoplasmas" (MONTFORT und FÖCKLER 1938, FÖCKLER 1938, MONTFORT und ROSENSTOCK 1950, ROSENSTOCK 1951) gilt nach wie vor als ungeklärt, wenngleich die neueren Arbeiten von BROWN und WEBSTER (1953) und von LEOPOLD und GUERNSEY (1954) ebenfalls für solche strahlungsbedingte Atmungsbeeinflussungen zu sprechen scheinen. In Fortsetzung unserer genannten Arbeiten wurden ausgedehnte Untersuchungen durchgeführt, die von folgenden Überlegungen ausgingen: In pflanzlichen Geweben absorbierte Strahlungsenergie kann dortselbst in Wärme umgewandelt werden. Ist dies der Fall, so kommt es innerhalb und in unmittelbarer Umgebung der bestrahlten Gewebe zu Temperaturerhöhungen (TRANQUILLINI 1954, SCHANDERL 1955). Während sich Temperatursteigerungen außerhalb der bestrahlten Gewebe durch entsprechende Versuchstechniken weitgehend vermeiden lassen, ist die Verhinderung von Temperaturänderungen im Gewebe selbst im Anschluß an Strahlungsabsorption experimentell nur sehr schwierig oder mit den heute üblichen Methoden teilweise überhaupt nicht zu bewerkstelligen. Dies dürfte ein Grund dafür sein, daß auf dem gesamten Gebiet der Strahlungsphysiologie meines Wissens bis jetzt kaum Versuche existieren, in denen die Temperatur vor, während und nach Bestrahlungen nicht nur außerhalb des Versuchsmateriales, sondern auch *innerhalb* desselben konstant gehalten wurde.

Da diese Tatsache insbesondere auch für die bisherigen Lichtatmungsuntersuchungen gilt, so war es Aufgabe der vorliegenden Versuche festzustellen, ob die früher von uns ermittelten — und als bedeutsam für die Beurteilung einer lichtbedingten Atmungsbeeinflussung angesehenen — spektralen Wirkungskurven der CO_2-Entbindung verschiedenartiger Gewebe nicht als Ergebnisse direkter Lichtwirkungen anzusehen sind, sondern vielmehr als die Folgen lichtabsorptionsbedingter

Temperaturänderungen im Gewebe selbst, demgemäß als Folgen *indirekter* Lichtwirkungen.

Methodik. Um Vergleiche mit unseren früheren Untersuchungen anstellen zu können, werden die Versuche mit Parenchym aus der Knolle von *Solanum tuberosum*, Sorte „Bona", durchgeführt. Aus den Kartoffelknollen werden dabei kleine zylindrische Stücke ausgeschnitten und im Zentrum ausgehöhlt. In die Höhlung des Kartoffelparenchymzylinders wird ein Thermometer mit $^1/_{10}$ Grad-Einteilung so eingeführt, daß das Reservoir des Thermometers allseits von einem 1,5 bis 2 mm dicken Parenchymmantel umgeben ist. Das so präparierte Material gelangt in die mittels einer Quarzglasscheibe abgeschlossene Versuchskammer und wird bei einem ständigen, wasserdampfgesättigten, CO_2-freien Preßluftstrom von 15 Liter Strömungsgeschwindigkeit je Stunde auf die Temperaturänderungen im Innern des Gewebes bei Bestrahlung unter verschiedenen Filtern untersucht. Ein zweites Thermometer dient zur Kontrolle der Temperatur in der Versuchskammer außerhalb des Gewebes[1]. Die Bestrahlung erfolgt mit einer Osram-Glühlampe 500 Watt aus 30 cm Entfernung (davon 15 cm Kühlwasserschicht). Die Begrenzung des eingestrahlten Lichtes nach dem langwelligen Teil des Spektrums erfolgt bei jedem Versuch durch das SCHOTTsche Wärmeschutzfilter BG 17, das die Strahlung oberhalb 700 mμ geschwächt und oberhalb 1000 mμ überhaupt nicht mehr nennenswert durchläßt. Die Begrenzung des eingestrahlten Lichtes nach dem kürzerwelligen Teil des Spektrums erfolgt durch die zusätzliche Vorschaltung jeweils eines Schott-Filters, wobei jedes nachfolgende Filter das einwirkende Spektrum um etwa 30 bis 70 mμ nach dem kürzerwelligen Teil gegenüber dem vorhergehenden Filter erweitert (Differenzfilterverfahren). Folgende Filterserie wird zusätzlich BG 17 verwendet: RG 8, RG 2, RG 1, OG 2, GG 11, GG 5, Fensterglas 2 mm. Bei der Auswahl dieser Filter ist darauf geachtet worden, daß nur solche verwendet werden, die einen bestimmten Wellenbereich möglichst steil abschneiden.

Vergleichsweise erfolgt unter entsprechenden Versuchsbedingungen die Bestrahlung eines schwarzen, also total absorbierenden, angefeuchteten Wollstoffzylinders, der hinsichtlich Größe und Dicke dem Kartoffelparenchymzylinder entspricht und in den das gleiche Thermometer eingefügt wird (Prinzip der MOLLschen Thermosäule). Bei beiden Versuchsmaterialien erfolgt die Bestrahlung unter ständiger Kontrolle des Temperaturanstieges im Innern des Materiales so lange, bis sich praktisch Temperaturkonstanz eingestellt hat. Dies ist unter den gegebenen Bedingungen durchweg etwa 10—15 min nach Strahlungsbeginn der Fall. Zwischen den Bestrahlungsperioden liegen Dunkelphasen, in denen sich innerhalb der Objekte die Ausgangstemperatur von 20° C wieder einstellt.

Werden die unter den einzelnen Filtern gemessenen maximalen, konstanten Temperaturwerte der beiden Versuchsobjekte in einer graphischen Darstellung zusammengefaßt, so erhält man die im Differenzfilterverfahren ermittelten spektralen Temperaturkurven dieser Objekte. Kurve I in Abb. 1 zeigt die nach dem beschriebenen Verfahren gewonnene spektrale Temperaturkurve von Kartoffelparenchym. Die im Innern des Kartoffelparenchyms unter den einzelnen Filtern festgestellten Temperaturwerte sind dabei bezogen auf die unter entsprechenden Bestrahlungsbedingungen im Innern des Stoffzylinders gemessenen Temperaturwerte, die gleich 100 gesetzt sind (Abb. 1, *K*). Die Kurve, die die Mittelwerte aus 3 Meßreihen wiedergibt (die einzelnen Meßreihen unterscheiden sich kaum), spiegelt demgemäß die Verhältnisse so wieder, als ob mit spektral erweiterten und doch intensitätsgleichen Bereichen bestrahlt worden wäre. Auf diese Weise ist es möglich, die neu gewonnene spektrale Temperaturkurve von Kartoffelparenchym

[1] Im Schatten der bestrahlten Gewebe gemessen.

mit der früher ermittelten spektralen Wirkungskurve der CO_2-Entbindung des gleichen Materiales zu vergleichen.

Die spektrale Temperaturkurve von Kartoffelparenchym (Abb. 1, *I*) zeigt einen auffälligen Verlauf: Während durch die langwellige Rotstrahlung ($\lambda > 700$ mμ) eine — bezogen auf die Kontrolle — beträchtliche Temperatursteigerung im Innern des Gewebes herbeigeführt wird, ist dies nach Zugabe der rot-orange Strahlung in viel geringerem Maße der Fall. Bei sukzessiver Erweiterung des einwirkenden Lichtes um den gelb-grünen, den grünen und schließlich den blauen Bereich des Spektrums, wie es durch Vorschalten der Filter OG 2, GG 11, GG 5 geschieht, tritt wieder eine zunehmende Erwärmung des Gewebes in Erscheinung. Unter Filter GG 5 wird dabei mit einer Temperaturerhöhung von 0,6° C unter den gegebenen Bedingungen der maximale Steigerungswert bei Bestrahlung mit sichtbaren Wellenlängen überhaupt erreicht. Wird nämlich das einwirkende Licht durch die Vorschaltung von Fensterglas (2 mm) noch durch die violette Strahlung ergänzt, so daß nunmehr das gesamte sichtbare Spektrum der Glühlampe auf das Gewebe einwirkt, dann ist die Erwärmung wieder weniger hoch als unter den vorher verwendeten Filtern GG 5 und GG 11.

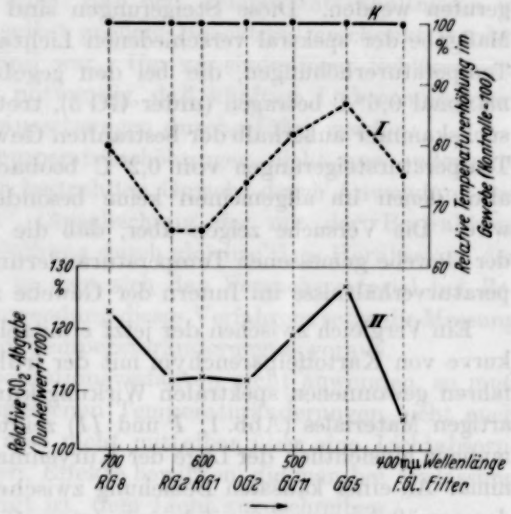


Abb. 1. Vergleich zwischen spektraler Temperaturkurve und spektraler Wirkungskurve der CO_2-Entbindung von Kartoffelparenchym. *K* = Kontrolle, *I* = Spektrale Temperaturkurve; ermittelt mit Osram-Glühlampe gewöhnlicher Bauart. *II* = Spektrale Wirkungskurve der CO_2-Entbindung; ermittelt mit Osram-Ultra-Vitalux-Lampe. (Nach MONTFORT und ROSENSTOCK, 1950.) Erläuterung im Text.

Die spektrale Temperaturkurve von Kartoffelparenchym zeigt also in dem Bereich der untersuchten sichtbaren Wellenlängen neben zwei Erwärmungsmaxima auch zwei Minima der Temperatursteigerung. Die ersteren werden erreicht bei Bestrahlung mit Wellenlängen oberhalb 700 mμ sowie bei Zugabe von Wellenlängen zwischen 550 bis 440 mμ zu den längerwelligen Strahlen. Erwärmungsminima erhält man einerseits bei Zugabe von Wellenlängen zwischen 650 bis 600 mμ und zum anderen auch bei Zugabe von Wellenlängen um 400 mμ zu den jeweils längerwelligen Strahlen.

Die beschriebene Kurve macht deutlich, daß in den Bestrahlungsperioden trotz Verwendung einer 15 cm dicken Wasserschicht und zusätzlicher Vorschaltung eines „Wärmeschutzfilters" BG 17 allein durch die von diesen Vorlagen durchgelassenen Wellenlängen unter jedem Filter Temperatursteigerungen im Innern des Gewebes hervorgerufen werden. Diese Steigerungen sind aber unterschiedlich nach Maßgabe der spektral verschiedenen Lichtabsorption im Gewebe. Die Temperaturerhöhungen, die bei den gegebenen Versuchsbedingungen maximal 0,6° C betragen (unter GG 5), treten ein, obwohl in der Versuchskammer außerhalb der bestrahlten Gewebe in Luft[1] nur maximale Temperatursteigerungen von 0,2° C beobachtet werden, Steigerungen also, denen im allgemeinen keine besondere Bedeutung zugemessen wird. Die Versuche zeigen aber, daß die bei Bestrahlung außerhalb der Gewebe gemessenen Temperaturänderungen kein Maß für die Temperaturverhältnisse im Innern der Gewebe zu sein brauchen.

Ein Vergleich zwischen der jetzt ermittelten spektralen Temperaturkurve von Kartoffelparenchym mit der früher nach dem gleichen Verfahren gewonnenen spektralen Wirkungskurve der CO_2-Abgabe gleichartigen Materiales (Abb. 1, *I* und *II*) zeigt weitgehende Übereinstimmungen hinsichtlich der Lage der Kurvenmaxima sowie auch deren Minima. An einer kausalen Beziehung zwischen beiden Vorgängen dürfte demgemäß kaum zu zweifeln sein (geringfügige Unterschiede zwischen beiden Kurven dürften ihre Ursache in der nicht völlig übereinstimmenden spektralen Energieverteilung der verwendeten Lichtquellen haben).

Eingehende Versuche diese kausale Beziehung betreffend haben gezeigt, daß die unter den verschiedenen Filtern festzustellenden unterschiedlichen Temperatursteigerungen bei Kartoffelparenchym die Ursache sind für die unter den entsprechenden Filtern erzielten unterschiedlichen Stimulationen der CO_2-Abgabe dieser Gewebe. Die Übereinstimmung der in gleicher Weise ermittelten spektralen Wirkungskurven der CO_2-Entbindung aller früher untersuchten Gewebe (Dunkel- und Lichtgewebe) läßt darauf schließen, daß alle diese Wirkungskurven als die Folgen lichtabsorptionsbedingter, unterschiedlicher Temperaturänderungen im Gewebe selbst, demgemäß als Folgen *indirekter* Lichtwirkungen, anzusehen sind. In einer neuerlich erschienenen Mitteilung (ROSENSTOCK 1955) konnte bereits kurz mitgeteilt werden, daß in der Tat auch direkt, unabhängig von einer Lichtabsorption, herbeigeführte Temperaturerhöhungen größeren und kleineren Ausmaßes zeitlich begrenzte Stimulationen der CO_2-Abgabe bei Kartoffelparenchym bewirken können, so wie solche Wirkungen früher im Licht gefunden wurden. Ausführlicher werden die diesbezüglichen Probleme an anderer Stelle

[1] Im Schatten der bestrahlten Gewebe gemessen.

behandelt ebenso wie jene Fragen, die die kausalanalytische Deutung der temperaturbedingten Reaktionen betreffen.

Die vorliegenden Untersuchungen sind zu wenig umfassend, als daß sie die Verneinung *jeglichen* direkten Einflusses sichtbarer Strahlen (ganz abgesehen von den ultravioletten Strahlen) auf das Atmungssystem rechtfertigten. Sie zeigen aber, daß den Temperaturverhältnissen in den bestrahlten Geweben selbst größere Beachtung geschenkt werden muß als dies bisher der Fall war. Um zu eindeutigen Schlüssen zu kommen, scheint es daher notwendig, daß künftige Lichtatmungsversuche unter folgenden Voraussetzungen durchgeführt werden:

1. Vermeidung von Temperaturerhöhungen nicht nur außerhalb, sondern auch innerhalb der bestrahlten Gewebe durch Anwendung des „Kompensationsverfahrens" (Ausgleichung der mit der Bestrahlung verbundenen Temperaturerhöhung durch gleichzeitiges Herabsetzen der Temperatur des Mediums, in dem sich das Versuchsmaterial bei Bestrahlung befindet). Die Anwendung dieses Verfahrens setzt die Messung der im Gewebe erfolgenden Temperaturänderungen voraus.

2. Läßt sich das Kompensationsverfahren nicht anwenden, so muß geprüft werden, ob die gemessenen Temperaturänderungen nicht auch dann, wenn sie direkt — also nicht mittelbar über eine Lichtabsorption — herbeigeführt werden, Effekte bewirken, die man bei Auslassung dieser Prüfung leicht geneigt ist, dem Licht zuzuschreiben.

3. Bei Untersuchungen über die Wirkung einzelner Lichtqualitäten sollte auch die spektrale Temperaturkurve der jeweils bestrahlten Gewebe ermittelt und nicht nur mit intensitätsgleichem, sondern auch mit *temperaturgleichem* Licht gearbeitet werden.

Die vorliegenden Untersuchungen lehren, daß die Frage, ob direkte oder indirekte Lichtwirkungen vorliegen, dann mit größter Vorsicht beurteilt werden muß, wenn die vorher genannten Voraussetzungen nicht erfüllt sind. Da es sich hierbei um einen Fragenkomplex handelt, der nicht nur im Bereich der Gaswechseluntersuchungen von Bedeutung ist, so scheint der Gedanke nicht abwegig, daß die vorher genannten Voraussetzungen bei lichtphysiologischen Untersuchungen *allgemein* beachtet werden sollten.

Literatur.

Brown, A. H., and G. C. Webster: Amer. J. Bot. **40**, 753 (1953). — Föckler. H.: Jb. wiss. Bot. **87**, 45 (1938). — Leopold, A. C., u. F. S. Guernsey: Physiol, Plantarum (Copenh.) **7**, 30 (1954). — Montfort, C., u. H. Föckler: Planta (Berl.) **28**, 938 (1938). — Montfort, C., u. G. Rosenstock: Z. Naturforsch. **5b**, 171 (1950). — Rosenstock, G.: Planta (Berl.) **40**, 70 (1951); **45**, 208 (1955). — Schanderl, H.: Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 28 (1955). — Tranquillini, W.: Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 191 (1954).

Dr. G. Rosenstock, Frankfurt a. M., Senckenberg-Anlage 27,
Botanisches Institut der Universität.

Autorenverzeichnis des 45. Bandes.

Bartels, F., Cytologische Studien an Leukoplasten unterirdischer Pflanzenorgane. S. 426.

Bogen, H. J., und U. Elste, Zur Physiologie der Acridinorange-Wirkung. Untersuchungen an Hefezellen. S. 325.

— und G. Follmann, Osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme bei Diatomeen. (Untersuchungen über die „spezifische Permeabilität" der Diatomeen.) S. 125.

Bopp, M., Die Entwicklung von Zelle und Kern im Protonema von *Funaria hygrometrica* Sibth. S. 573.

Bosian, G., unter Mitarbeit von A. Ensgraber, Über die Vollautomatisierung der CO_2-Assimilationsbestimmung und zur Methodik des Küvettenklimas. S. 470.

Brodführer, U., Der Einfluß einer abgestuften Dosierung von ultravioletter Sonnenstrahlung auf das Wachstum der Pflanzen. S. 1.

Butterfass, Th. s. Strugger, S. S. 549.

Eberhardt, F., Der Atmungsverlauf alternder Blätter und reifender Früchte. S. 57.

Elste, U. s. Bogen, H. J. S. 325.

Esdorn, I., und G. Nöll, Untersuchungen über tagesperiodische Schwankungen im Gehalt an Flavonolen bei *Fagopyrum*-Arten. Kurze Mitteilung. S. 376.

Farkas, G. L., und T. Rajháthy, Untersuchungen über die xeromorphischen Gradienten einiger Kulturpflanzen. S. 535.

Fink, E. s. Kandler, O. S. 289.

Follmann, G. s. Bogen, H. J. S. 125.

Franke, W., Über die Biosynthese des Vitamins C. II. Mitteilung. Zur Biochemie und Physiologie der Vitamin C-Synthese. S. 166.

Gottschalk, W., Vergleichend cytologische Untersuchungen an den Ruhe- und Arbeitskernen verschiedener pflanzlicher Gewebe. S. 147.

Hülsbruch, M. s. Schumacher, W. S. 118.

Kandler, O., und E. Fink, Über die Abhängigkeit des synthetischen Wirkungsgrades in vitro kultivierter Embryonen von verschiedenen Außenfaktoren. S. 289.

Kasperlik, H. s. Witsch, H. v. S. 264.

Kausch, W., Die Samenkeimung im Tensiostaten. S. 82.

— Saugkraft und Wassernachleitung im Boden als physiologische Faktoren. Unter besonderer Berücksichtigung des Tensiometers. S. 217.

Knapp, R. s. Linskens, H. F. S. 106.

Keser, M., Papierchromatographische Untersuchungen über das Auftreten freier und gebundener Aminosäuren in höheren Pflanzen. S. 273.

Kessler, E., Über die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf Nitratreduktion und Atmung von Grünalgen. S. 94.

Libbert, E., Das Zusammenwirken von Wuchs- und Hemmstoffen bei der korrelativen Knospenhemmung. S. 68.

— Nachweis und chemische Trennung des Korrelationshemmstoffes und seiner Hemmstoffvorstufe. S. 405.

Linskens, H. F., und R. Knapp, Über die Ausscheidung von Aminosäuren in reinen und gemischten Beständen verschiedener Pflanzenarten. S. 106.

Matthaei, H. s. Schumacher, W. S. 213.

Metzner, H., Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induktion. S. 493.

Nöll, G. s. Esdorn, I. S. 376.

Rajháthy, T. s. Farkas, G. L. S. 535.

Resch, A., Beiträge zur Cytologie des Xylems. S. 307.

Richards, F. J., Über einige Fragen betreffend die Messung von Blattstellungen. S. 198.

Reznik, H., Über den histochemischen Nachweis der an der Verholzung beteiligten β-Glucosidasen. S. 455.

Rosenstock, G., Die Zeitwirkung von Temperaturänderungen auf die CO_2-Abgabe von Kartoffelparenchym. Kurze Mitteilung. S. 208.

— Die spektrale Temperaturkurve von Kartoffelparenchym und ihre Bedeutung für das Lichtatmungsproblem. S. 591.

Schumacher, W., und M. Hülsbruch, Zur Frage der Bewegung fluorescierender Farbstoffe im Pflanzenkörper. S. 118.

— und H. Matthaei, Über den Zusammenhang zwischen Streckungswachstum und Eiweißsynthese. S. 213.

Söding, H., und M. Wagner, Mehrjährige Versuche über die Beeinflussung der Keimung und Entwicklung von *Poa annua* durch Behandlung der Früchte mit Wirkstoffen. S. 557.

Steffen, K., Kern- und Nucleolenwachstum bei endomitotischer Polyploidisierung. (Ein Beitrag zur karyologischen Anatomie von *Pedicularis palustris* L.) S. 379.

— und F. Walter, Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Feinbau des Chromatophors von *Ankistrodesmus braunii* (Nägeli) Brunnthaler. S. 395.

Strugger, S., und Th. Butterfass, Zur fluorescenzmikroskopischen Analyse des extrafasciculären Wasserweges in der Avena-Koleoptile. S. 549.

Wagner, M. s. Söding, H. S. 557.

Walter, F. s. Steffen, K. S. 395.

Witsch, H. v., und H. Kasperlik, Untersuchungen über den Einfluß der 2,4-D auf den Aneuringehalt 2,4-D-empfindlicher und -resistenter Pflanzen. S. 264.